

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΜΣ «ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΙΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ, ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΙΚΗ
ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ**

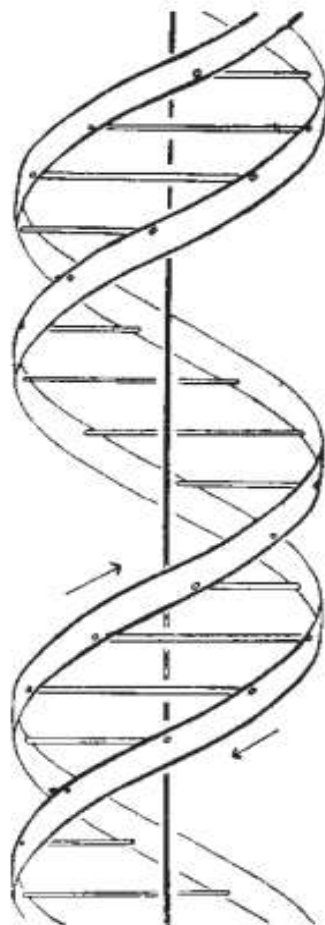
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΘΕΛΟΥΡΑΣ

Α.Μ.Φ. 180111144

ΛΑΡΙΣΑ 2013

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
**ΘΕΙΟΠΥΡΑΝΟΝΟΥΚΛΕΟΖΙΤΕΣ: ΣΥΝΘΕΣΗ,
ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ**

MASTER THESIS
**THIOPYRANONUCLEOSIDES: SYNTHESIS,
ANTICANCER AND ANTIVIRAL EVALUATION**



Εικόνα πάνω: Image from 'A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid', Watson J.D. and Crick F.H.C., Nature 171, 737-738 (1953)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΚΑΘΗΓΗΤΩΝ

Δημήτριος Κομιώτης, Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Παναγιώτης Μαρκουλάτος, Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αιμιλία Ζίφα, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας- Νευροβιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική διατριβή, αποτελεί το κύριο μέρος εργασίας του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών που φέρει τον τίτλο «Ποιότητα στην Διατροφή και το Περιβάλλον».

Η συγγραφή της εργασίας “Θειοκυανονουκλεοζίτες: Σύνθεση, αντικαρκινική και αντική αποτίμηση” έγινε στο τρίτο και τελευταίο ακαδημαϊκό εξάμηνο του προγράμματος, και απαιτήσε αρκετές ώρες μελέτης και πρακτικής εξάσκησης, στο Εργαστήριο της Βίο-Οργανικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Με την ένταξη μου στο ανθρώπινο δυναμικό του εργαστηρίου, βρέθηκα στην ευχάριστη θέση να συμμετάσχω σε ερευνητικές δραστηριότητες της εργαστηριακής ομάδας και αυτή η έρευνα παρουσιάζεται υπό μορφή τεύχους, ως μεταπτυχιακή εργασία.

Η εργασία αυτή, χωρίζεται σε δύο μέρη, το θεωρητικό και το ειδικό. Το πρώτο μέρος, εισαγωγικά παρουσιάζει συμπυκνμένα όλο το υλικό που απαιτείται για τη κατανόηση και υποστήριξη της επικείμενης έρευνας, προοδευτικά από βασικές γνώσεις σε πιο περίπλοκες. Το δεύτερο μέρος, περιγράφει τις πειραματικές μεθόδους και τα υλικά που μεταχειρίστηκαν, έχει ως κορμό το ερευνητικό κομμάτι, που είναι οι συνθετικές πορείες με τα στάδια αντιδράσεων, και ολοκληρώνεται με την επιβεβαίωση της μοριακής δομής του επιθυμητού μορίου με την φασματοσκοπική μέθοδο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (1H NMR). Στο τέλος, παρατίθενται τα αποτελέσματα της βιολογικής αποτίμησης, ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα προς την αξιολόγηση τους για τις περεταίρω ερευνητικές και αναπτυξιακές ενέργειες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο του εργαστηρίου, Καθηγητή Βίο-Οργανικής Χημείας, κ. Δημήτριο Κομιώτη, που με δέχθηκε στο εργαστήριο του, για τις ευκαιρίες της επιστημονικής έρευνας και της πρακτικής εξάσκησης.

Θερμά ευχαριστώ την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Στυλιανή Μαντά για την υποστήριξη της, διότι καθημερινώς και ανελλιπώς, συντόνιζε τις τυπικές

δραστηριότητες του εργαστηρίου, συμβάλλοντας τόσο στην ευρυθμία όσο και στην αποδοτικότητα του συνόλου.

Επίσης, ευχαριστώ την Υποψήφια Διδάκτορα κα. Αθηνά Δημοπούλου, για την μετάδοση πρακτικών γνώσεων στο εργαστήριο, και για την βοήθεια της στο πειραματικό κομμάτι της πτυχιακής εργασίας, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που με βοήθησαν στην γενικότερη μεθοδολογία της έρευνας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου, και παλιούς και νέους φίλους, που στάθηκαν αρωγοί στην προσπάθεια μου να τελειώσω αυτό το μεταπτυχιακό, και να έχω αποκομίσει όσα δυνατόν περισσότερα μπορούσα από αυτήν την εμπειρία.

Σεπτέμβριος, 2013

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες	4
Πίνακας περιεχομένων	6
Εισαγωγή.....	8
1.1. Υδατάνθρακες	8
1.2. Ταξινόμηση υδατανθράκων	9
1.3. Μονοσακχαρίτες	10
1.3.1. Ισομέρεια	11
1.3.2. Κυκλική δομή των μονοσακχαριτών.....	12
1.3.3. Ανωμέρεια.....	14
1.3.4. Πολυστροφισμός	15
1.4. Στερεοδιαμορφώσεις	16
1.5. Γλυκοζιτικός δεσμός	17
1.6. Γλυκοζίτες	18
1.7. Νουκλεοζίτες	19
1.8. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες.....	22
1.8.1. Νουκλεοζίτες ως αντιϊκοί παράγοντες	23
1.8.2. Νουκλεοζίτες ως αντί-καρκινικοί παράγοντες.....	26
1.8.3. Τρόπος δράσης των τροποποιημένων νουκλεοζιτών.....	31
1.9. Πυρανονουκλεοζίτες	36
2.0. Θειοπουρίνες.....	37
2.1. 6-Μερκαπτοπουρίνη (6-MP)	38
2.2. 6-Θειογουανίνη (6-TG)	39
Ειδικό Μέρος.....	40
3.0. Στόχος – Σκοπός της μελέτης	40
3.1. Υλικά και Μεθοδολογία	41
3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων	41
3.2. Γενική Μεθοδολογία	41
3.2.1. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)	41
3.2.2. Χρωματογραφία Στήλης.....	43
3.2.3. Ξήρανση Διαλυτών	43
3.2.4. Ταυτοποίηση ενώσεων με την τεχνική ¹ H-NMR.....	44
3.3. Μέθοδοι	45
3.3.1. Επισκόπηση της συνθετικής οδού.....	45

3.4. Μεθοδολογία της σύνθεσης	47
3.4.1. Σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (2a).	48
3.4.2. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-θειοπυρίνης (4a).	49
3.4.3. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-χλωροπυρίνης (6a).	50
3.4.4. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (7a).	51
3.4.5. Σύνθεση της 7-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3a).	52
3.4.6. Σύνθεση της 9-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5a).	53
3.4.7. Σύνθεση της 9-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (8a).	54
3.4.8. Σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (2b).	55
3.4.9. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειοπυρίνης (4b).	56
3.4.10. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-χλωροπυρίνης (6b).	57
3.4.11. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (7b).	58
3.4.12. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-χλωροπυρίνης (9b).	59
3.4.13. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-θειογουανίνης (10b).	60
3.4.14. Σύνθεση της 7-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3b).	61
3.4.15. Σύνθεση της 9-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5b).	62
3.4.16. Σύνθεση της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (8b).	63
3.4.17. Σύνθεση της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (11b).	64
4.0. Ταυτοποίηση με ¹H NMR	65
4.1. Φάσμα ¹ H NMR της 9-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης.	65
4.2. Φάσμα ¹ H NMR της 9-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης.	66
5.0. Αποτελέσματα - Συζήτηση	67
6.0. Βιβλιογραφία	70

Εισαγωγή

Οι νουκλεοζίτες (ή νουκλεοσίδια), αποτελούνται από ένα σάκχαρο, κατ' εξοχήν, είτε ριβόζης είτε δεοξυριβόζης, που είναι ενωμένο με μια νουκλεϊκή βάση (εκ των πουρίνων ή των πυριμιδίνων). Η τροποποίηση, είτε στο σάκχαρο είτε στη βάση, δημιουργεί ένα νέο βιομόριο, που το ονομάζουμε ανάλογο ή τροποποιημένο νουκλεοζίτη, και δύναται με διάφορους μηχανισμούς να παρουσιάζει ισχυρή φαρμακευτική δράση έναντι ευρέως φάσματος νοσημάτων. Σε κάθε περίπτωση, κι όταν μεταξύ άλλων, το μόριο είναι σταθερό, επιβάλλεται να γίνει η βιολογική του αποτίμηση και ο καθορισμός της δράσης και των ιδιοτήτων του.

1.1. Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι μια πολυπληθής ομάδα χημικών ενώσεων, με χημικό τύπο $C_n(H_2O)_n$. Η ονομασία σάκχαρα, συνηθέστερα, αναφέρεται στα απλά μέλη της σειράς των ενώσεων αυτών. Αρχικά, θεωρήθηκε ότι είναι ενώσεις όπου άτομα άνθρακα είναι ενωμένα, με άτομα υδρογόνου κι άτομα οξυγόνου που έχουν την ίδια αναλογία με αυτή στο μόριο του νερού, εξού και το όνομα τους, υδατάνθρακας: 'ύδωρ' + 'άνθρακας'.

Οι υδατάνθρακες είναι ευρύτατα διαδομένοι στην φύση, αφού απαντούν σε κάθε ζωντανό οργανισμό και συνιστούν έως και το 75% ύλης του βιολογικού κόσμου. (1) Βρίσκονται στο φυτικό βασίλειο και σχηματίζονται κατά την φωτοσύνθεση, ενώ στο ζωικό βασίλειο, οι οργανισμοί τους προσλαμβάνουν δια μέσω της τροφής.

Διατροφικά, οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε διάφορες τροφές όπως, στα φρούτα, στο μέλι, στα λαχανικά, στα όσπρια, στα δημητριακά, στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, στο συκώτι, στο αίμα, σε ζωικούς ιστούς και αλλού.

Οι υδατάνθρακες, και κυρίως από την μητρική οργανική ένωση της γλυκόζης, στα φυτά μπορεί και βίο-συντίθεται και μετατρέπεται κυρίως σε άμυλο και κυτταρίνη, όπου χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας για τις φυτικές λειτουργίες αλλά κι ως αποταμιευτικό υλικό, αντίστοιχα. Ο ενεργειακός και δομικός

ρόλος των υδατανθράκων ισχύει και στο ζωικό βασίλειο, μόνο που εκεί η γλυκόζη μετατρέπεται σε γλυκογόνο που αποθηκεύεται στους μυς. Οι υδατάνθρακες συμμετέχουν τόσο στις αερόβιες όσο και στις αναερόβιες ενεργειακές οδούς ενώ αποτελούν την πλέον σημαντική πηγή ενέργειας για οποιαδήποτε σωματική δραστηριότητα και κυρίως την φυσική άσκηση. Ως δομικά συστατικά αποτελούν μέρος του περιβλήματος των κυττάρων και υπό άλλες μορφές συνιστούν μέρος του μορίου του DNA.

Πέρα από τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, έχουμε και την συμμετοχή τους σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες και κυρίως στην δημιουργία άλλων σημαντικών βιολογικών μορίων, όπως τους λιποπολυσακχαρίτες, τις γλυκοπρωτεΐνες, κ.α.

Ο σύγχρονος ορισμός των υδατανθράκων, ορίζει ότι είναι είτε πολυυδροξυαλδεΐδες είτε πολυυδροξυκετόνες ή ουσίες οι οποίες όταν αντιδρούν με νερό δίνουν τέτοιες ενώσεις. Οι υδατάνθρακες είναι ιδιαίτερα δραστικά μόρια που διαθέτουν μια μόνο καρβονυλομάδα $[>C=O]$ και περισσότερους άνθρακες ενωμένους με υδροξυλομάδες $[-OH]$, και συνεπώς από χημικής άποψης είναι αλδεΐδικά ή κετονικά παράγωγα πολυσθενών αλκοολών.

1.2. Ταξινόμηση υδατανθράκων

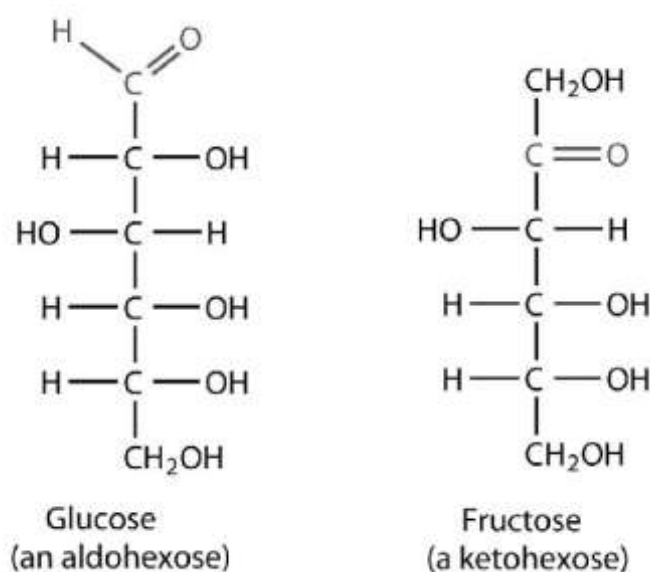
Οι υδατάνθρακες μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: τους μονοσακχαρίτες, τους ολιγοσακχαρίτες και τους πολυσακχαρίτες.

- Μονοσακχαρίτες: είναι απλά σάκχαρα που το καθένα περιέχει 3 με 9 άτομα άνθρακα, συνδεδεμένα όλα, εκτός από ένα, με μια υδροξυλομάδα. Το υπολειπόμενο άτομο άνθρακα αποτελεί μέρος μιας καρβονυλομάδας.
- Ολιγοσακχαρίτες: είναι μικρού μήκους πολυμερή αποτελούμενα από 2 μέχρι 10 μονάδες απλού σακχάρου.
- Πολυσακχαρίτες: είναι πολυμερή αποτελούμενα από περισσότερες των 10 μονάδων απλού σακχάρου. (2)

1.3. Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες είναι τα απλούστερα μέλη της κατηγορίας των υδατανθράκων και το κύριο χαρακτηριστικό τους είναι ότι δεν επιδέχονται υδρόλυση. Είναι αλδεΐδες ή κετόνες με 2 ή περισσότερες χαρακτηριστικές ομάδες υδροξυλίου, και αντίστοιχα από την καρβονυλομάδα, ονομάζονται αλδόζες ή κετόζες.

Οι σημαντικότερες χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας, είναι οι εξής: η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η μαnnόζη και η γαλακτόζη. Η γλυκόζη, είναι το κοινό σάκχαρο τους αίματος και σπουδαία πηγή ενέργειας για τη λειτουργία του κυττάρου, ενώ η φρουκτόζη είναι το κοινό σάκχαρο των φρούτων και σημαντική πηγή τροφής. Όταν τα απλά σάκχαρα περιέχουν 3, 4, 5 ή 6 άτομα άνθρακα στο μόριό τους, διακρίνονται αντίστοιχα σε: τριόζες, τετρώζες, πεντόζες και εξόζες. Με την συνδυασμένη ονοματολογία, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν τα πλέον τυπικά παραδείγματα μιας αλδοεξόζης, και μιας κετοεξόζης, αντίστοιχα. (Εικ. 1)



Εικόνα 1. Γλυκόζη και Φρουκτόζη (κατά Fisher)

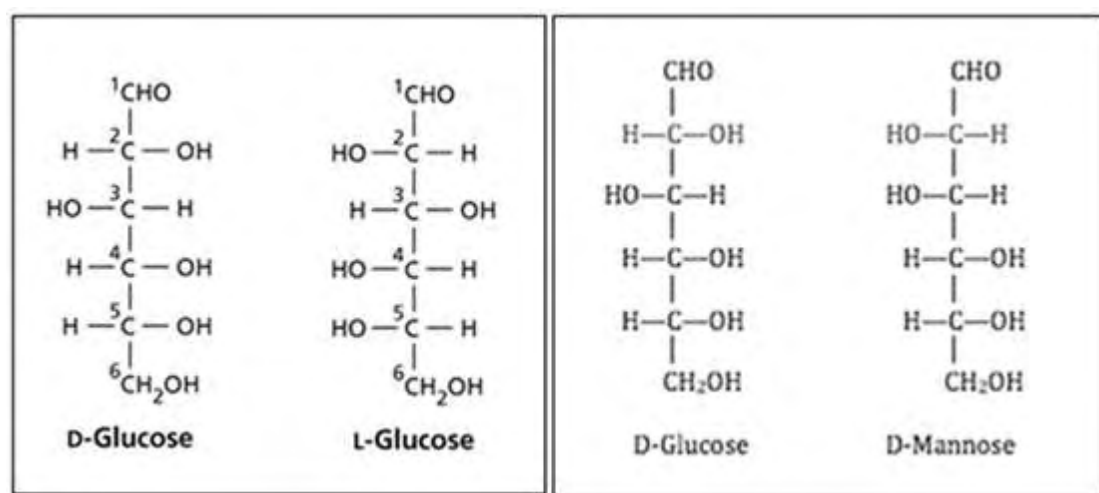
Οι εξόζες είναι η πιο ενδιαφέρουσα ομάδα μονοσακχαριτών, καθώς σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα πιο διαδεδομένα στη φύση σάκχαρα, αλδόζες ή κετόζες. Βρίσκονται είτε ελεύθερες στη φύση, είτε ως συστατικά πολυσακχαριτών και γλυκοζιτών.

1.3.1. Ισομέρεια

Γενικότερα, όπως και σε άλλες χημικές ενώσεις, έτσι και στους μονοσακχαρίτες, εμφανίζονται φαινόμενα συντακτικής ισομέρειας και στερεοϊσομέρειας. Η ύπαρξη στα μόρια των υδατανθράκων, ασύμμετρων ατόμων άνθρακα, έχει ως συνέπεια την εμφάνιση στερεοϊσομερών μορφών. Ο αριθμός των στερεοϊσομερών μιας ένωσης δίνεται από την σχέση 2^n όπου n ο αριθμός των ασύμμετρων ατόμων *C του μορίου της ένωσης. Για τις αλδοεξόζες, έχουμε 6 άτομα C, 4 στερεογονικά κέντρα, και άρα $2^4 = 16$ πιθανά στερεοϊσομερή.

Η γλυκόζη και η μαννόζη, είναι δυο αλδοεξόζες και πρόκειται για δύο διαφορετικά μόρια με τον ίδιο χημικό τύπο: $C_6H_{12}O_6$. Η διαφορετικότητα τους προκύπτει από την στερεοϊσομέρεια. Ο διαφορετικός δομικός τρόπος που συνδέονται οι υποκαταστάτες στο κεντρικό κορμό του μορίου έχει ως συνέπεια αυτές οι δύο ενώσεις να έχουν και διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες.

Έτσι, υπάρχουν τα ισομερή χειρομορφίας, ή εναντιομέρειας, όπως η D-γλυκόζη και η L-γλυκόζη, και διαστερομέρειας, όπως η D-γλυκόζη και η D-μαννόζη. Στην D-μαννόζη αναφερόμαστε ως το C-2 επιμερές της D-γλυκόζης. (Εικ. 2) Οι περισσότεροι μονοσακχαρίτες απαντούν στην D- μορφή τους.

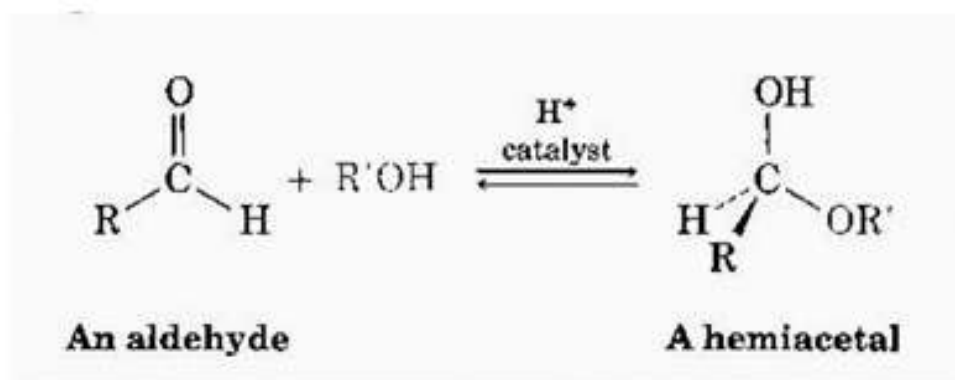


Εικόνα 2. Ισομερή και επιμερή της D-Γλυκόζης.

Επίσης, η ικανότητα δημιουργίας της κυκλικής δομής στους μονοσακχαρίτες δημιουργεί επιπλέον δυνατότητες διάταξης στο χώρο.

1.3.2. Κυκλική δομή των μονοσακχαριτών

Οι μονοσακχαρίτες υπάρχουν τόσο στην ανοικτή (γραμμική) τους μορφή, όσο και σε μορφή δακτυλίου. Η δομή των απλών σακχάρων έχει αποδειχθεί ότι είναι κυκλική μέσω σχηματισμού ενδιάμεσης ημιακεταλικής μορφής, καθώς χαρακτηριστικές αντιδράσεις δεν μπορούν να δικαιολογηθούν από τις γραμμικές μορφές των μορίων. Είναι γνωστό ότι, οι αλκοόλες πραγματοποιούν μια γρήγορη και αντιστρεπτή πυρηνόφιλη προσθήκη με αλδεΐδες ή κετόνες προς σχηματισμό ημιακεταλών. (Εικ. 3)



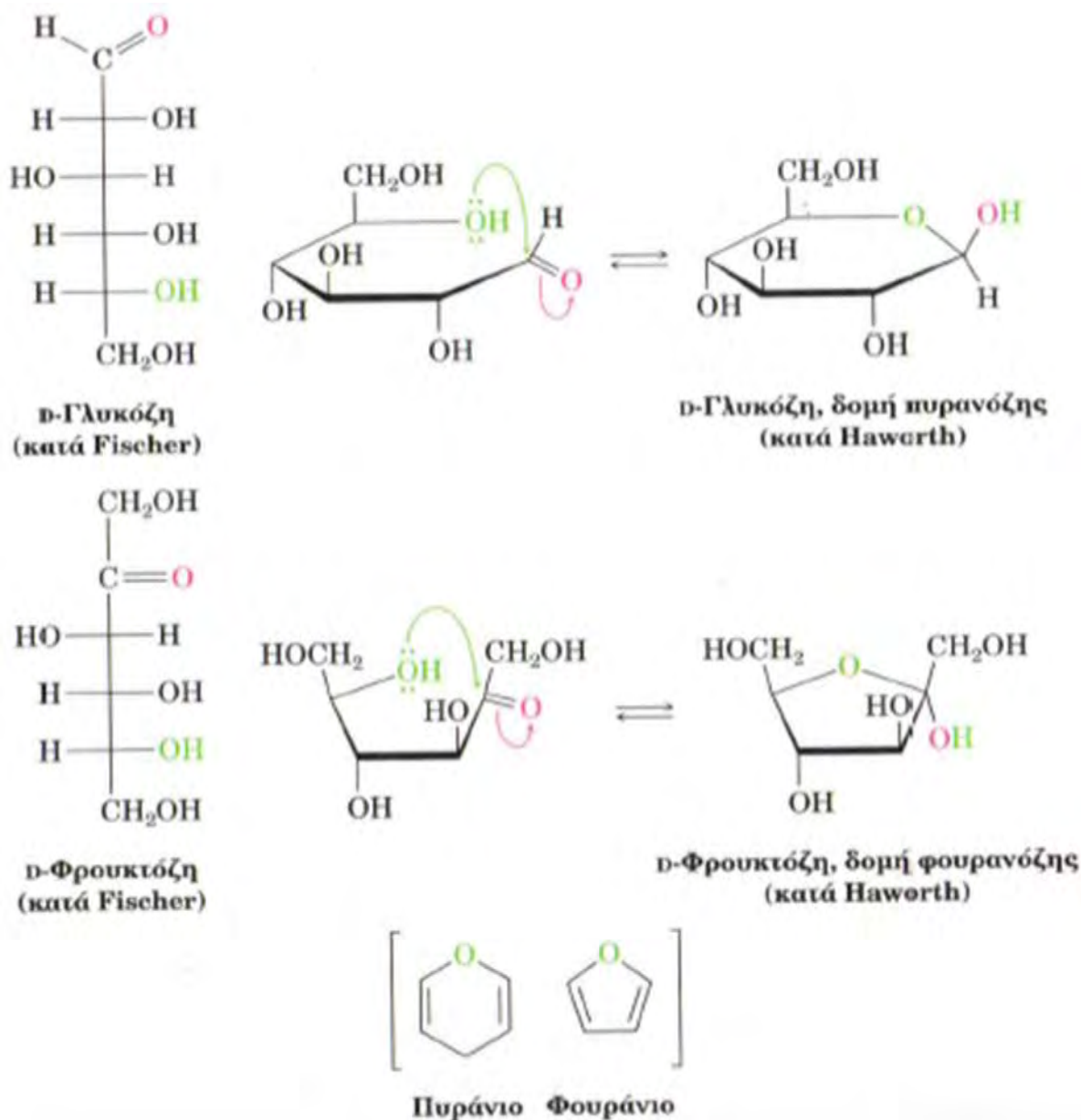
Εικόνα 3. Αντίδραση σχηματισμού ημιακετάλης

Εάν, η υδροξυλομάδα και το καρβονύλιο βρίσκονται στο ίδιο μόριο, μπορεί να λάβει χώρα ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη, που οδηγεί στο σχηματισμό μιας κυκλικής ημιακετάλης. Οι πενταμελείς και εξαμελείς κυκλικές ημιακετάλες είναι ιδιαίτερα σταθερά μόρια, γι' αυτό αρκετοί υδατάνθρακες απαντούν σε κατάσταση ισορροπίας ανάμεσα στις δομές ανοικτής και κλειστής αλυσίδας.

Για παράδειγμα, η γλυκόζη σε υδατικό διάλυμα απαντά με τη δομή του εξαμελούς δακτυλίου της πυρανόζης, που οφείλεται στην ενδομοριακή πυρηνόφιλη προσθήκη του $[-\text{OH}]$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C1.

Η φρουκτόζη, αντίθετα, απαντά κατά 80% στην πυρανοζική δομή και κατά 20% στη δομή του πενταμελούς δακτυλίου της φουρανόζης, που σχηματίζεται από την προσθήκη του $[-\text{OH}]$ του C5 στον καρβονυλικό άνθρακα C2.

Οι ονομασίες πυρανόζη για τον εξαμελή δακτύλιο και φουρανόζη για τον πενταμελή δακτύλιο προέρχονται από τις ονομασίες των απλών κυκλικών αιθέρων πυράνιο και φουράνιο. Οι κυκλικές δομές της γλυκόζης και της φρουκτόζης παρατίθενται στην επόμενη εικόνα (Εικ. 4)

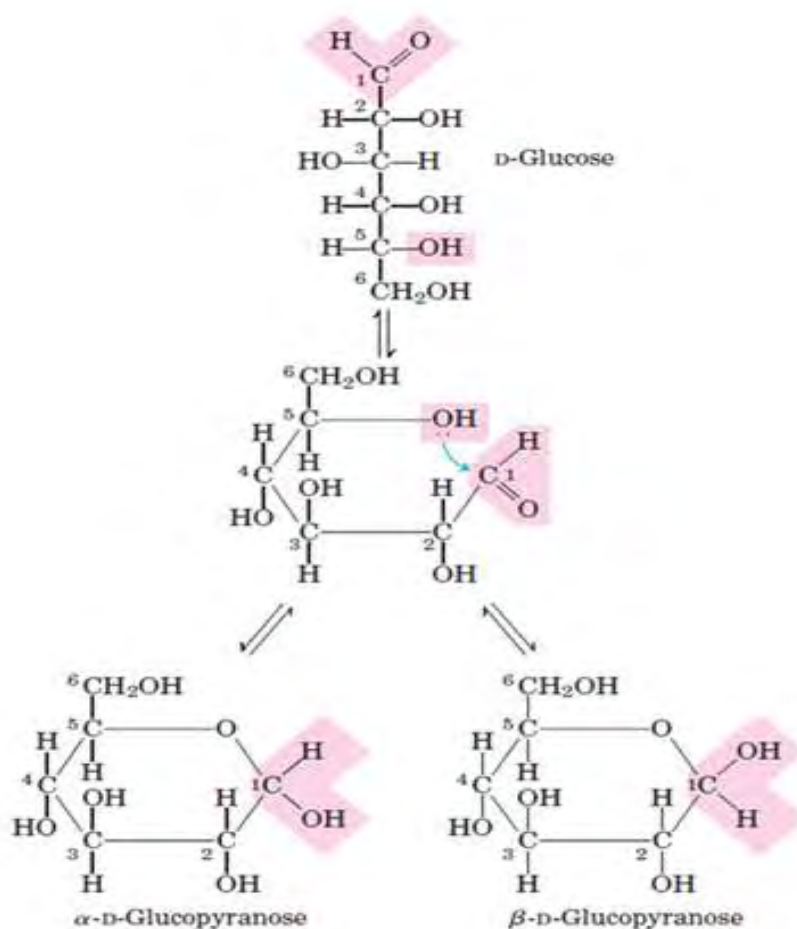


Εικόνα 4. Κυκλικές δομές της D-Γλυκόζης και της D-Φρουκτόζης

Την μορφή της πυρανόζης έχουν κατά κύριο λόγο τα σάκχαρα που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην Βιοχημεία.

1.3.3. Ανωμέρεια

Όταν η ανοικτή αλυσίδα ενός μονοσακχαρίτη υποστεί κυκλοποίηση, αποκτώντας τη δομή της φουρανόζης ή της πυρανόζης, σχηματίζεται ένα νέο στερεογονικό κέντρο στη θέση του πρώην καρβονυλικού άνθρακα. Τα δύο νέα διαστερομερή ονομάζονται ανωμερή και ο ημιακεταλικός άνθρακας ανωμερικό κέντρο. Για παράδειγμα, η γλυκόζη κυκλοποιείται αντιστρεπτά σε υδατικό διάλυμα, σχηματίζοντας ένα μίγμα δυο ανωμερών σε αναλογία 36:64. (Εικ. 5) Το δευτερεύον ανωμερές, στο οποίο η ομάδα $[-OH]$ του C1 βρίσκεται σε θέση *trans* ως προς τον υποκαταστάτη $[-CH_2OH]$ του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα κάτω στην προβολή κατά Haworth), ονομάζεται α ανωμερές και η πλήρης ονομασία του είναι α -D-γλυκοπυρανόζη. Το κύριο ανωμερές, στο οποίο η ομάδα $[-OH]$ του C1 βρίσκεται σε θέση *cis* ως προς τον υποκαταστάτη $[-CH_2OH]$ του C5 (δηλ. με κατεύθυνση προς τα πάνω στην προβολή κατά Haworth), ονομάζεται β ανωμερές. Η πλήρης ονομασία του είναι β -D-γλυκοπυρανόζη.



Εικόνα 5. α -D- και β -D- Γλυκοπυρανόζη.

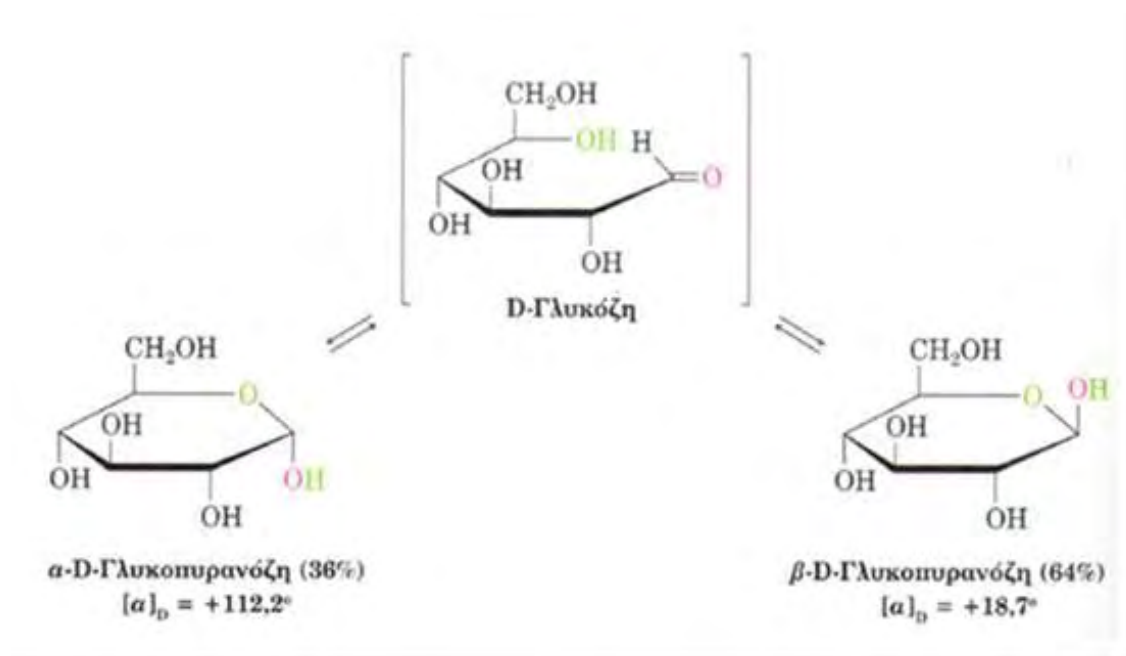
1.3.4. Πολυστροφισμός

Και τα δύο ανωμερή της D-γλυκοπυρανόζης μπορούν να κρυσταλλωθούν και να απομονωθούν.

Η καθαρή α-D-γλυκοπυρανόζη έχει σημείο τήξεως 146°C και ειδική στροφή $[\alpha]_D = +112,2^\circ$, ενώ η καθαρή β-D-γλυκοπυρανόζη έχει σημείο τήξεως 148 - 155°C και ειδική στροφή $[\alpha]_D = +18,7^\circ$. Όταν όμως κάποιο από τα δύο ανωμερή διαλυθεί σε νερό, η ειδική στροφή μεταβάλλεται αργά και τελικά καταλήγει στις $+52,6^\circ$. Η ειδική στροφή του α ανωμερούς μειώνεται σταδιακά από τις $+112,2^\circ$ στις $+52,6^\circ$, ενώ του β ανωμερούς αυξάνεται από τις $+18,7^\circ$ στις $+52,6^\circ$.

Δηλαδή, κατόπιν διάλυσης ενός ανωμερούς στο νερό, γίνεται σταδιακή μετατροπή της αρχικά καθαρής μορφής στο άλλο ανωμερές. (Εικ. 6)

Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως πολυστροφισμός και οφείλεται στην αργή μετατροπή του καθαρού α ή του καθαρού β ανωμερούς, έτσι ώστε να επιτευχθούν οι συνθήκες ισορροπίας (36:64) στο διάλυμα. (3)



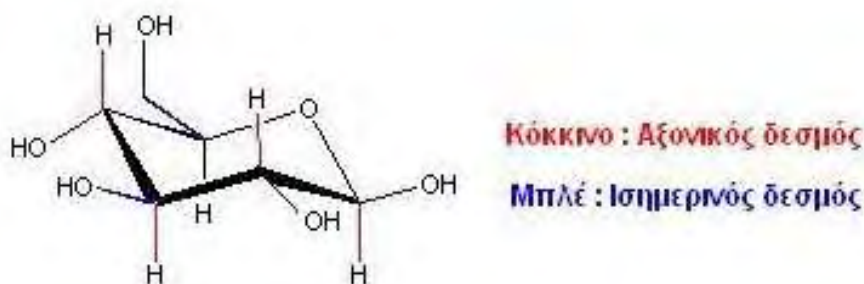
Εικόνα 6. Πολυστροφισμός.

1.4. Στερεοδιαμορφώσεις

Η στερεοδιάταξη του δακτυλίου παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον λόγω της συμπεριφοράς των υποκατάστατων του, όσον αφορά την διάταξή τους σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου. Συγκεκριμένα διακρίνονται δυο είδη υποκαταστάτων: οι αξονικοί και οι ισημερινοί. Ως αξονικοί υποκαταστάτες ορίζονται οι υποκαταστάτες που βρίσκονται παράλληλα στον άξονα του δακτυλίου, δηλαδή κάθετα στο επίπεδό του. Αντιθέτως, οι ισημερινοί υποκαταστάτες βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο με τον δακτύλιο. (Εικ. 7)

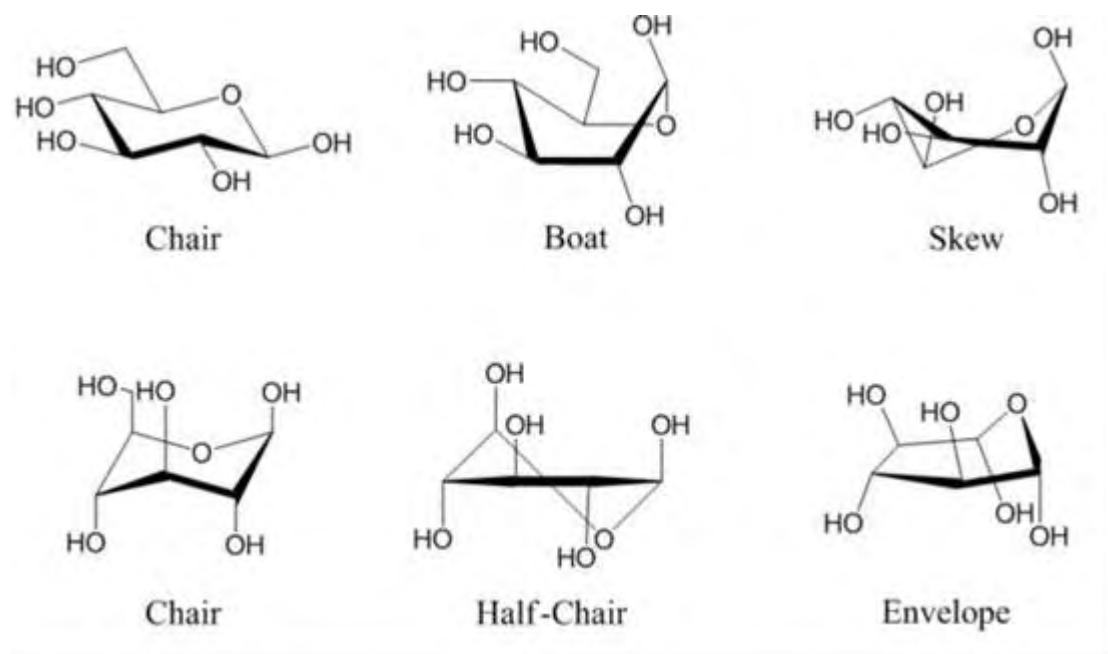
Τα παραπάνω έχουν επίπτωση στην χημική συμπεριφορά του μορίου. Δύναται να εμφανιστούν φαινόμενα στερεοχημικής παρεμπόδισης μεταξύ αξονικών υποκαταστάτων, εκτός υδρογόνου, αν αυτοί βρεθούν στην ίδια πλευρά του δακτυλίου. Το αν θα εμφανιστούν έχει σχέση με την φύση του υποκαταστάτη όπως την ακτίνα *Van der Waals* του και την πυκνότητα του νέφους ηλεκτρονίων. Οι ισημερινοί υποκαταστάτες δεν παρουσιάζουν αυτό το φαινόμενο, οπότε η υποκατάσταση στο ισημερινό επίπεδο είναι κατά κόρον σταθερότερη.

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται είναι η αλληλεπίδραση αξονικών και ισημερινών υποκαταστάτων, που προκαλεί τάση στο μόριο ικανή να το διαμορφώσει περαιτέρω στερεοχημικά. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται 1,3-διαξονική αλληλεπίδραση οφείλεται στην στερεοχημική τάση και εξαρτάται από το μέγεθος όπως επίσης και την φύση του εκάστοτε υποκαταστάτη. Ως αποτέλεσμα του παραπάνω οι φουρανόζες και οι πυρανόζες δεν είναι επίπεδες στον χώρο αλλά μπορούν να υιοθετήσουν διάφορες στερεοδιαμορφώσεις.



Εικόνα 7 Αξονικοί και Ισημερινοί δεσμοί

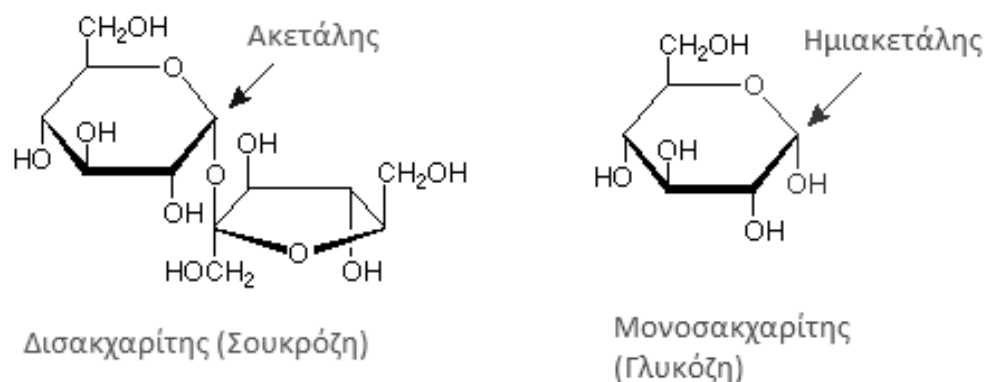
Ο δακτύλιος της πυρανόζης μπορεί να λάβει τις μορφές chair, boat, half-chair, skew, και envelope (Εικ. 8) ενώ ο δακτύλιος της φουρανόζης μπορεί να λάβει λιγότερες μορφές στεreoχημικών διαμορφώσεων, δηλ. τις μορφές envelope και twist.



Εικόνα 8. Διαμορφώσεις της β-D-γλυκοπυρανόζης.

1.5. Γλυκοζιτικός δεσμός

Οι πολυσακχαρίτες είναι υδατάνθρακες που περιέχουν πολλές (συντά εκατοντάδες ή και χιλιάδες) μονομερείς μονάδες συνδεδεμένες με ομοιοπολικούς δεσμούς, οι οποίοι καλούνται γλυκοζιτικοί δεσμοί.



Εικόνα 9. Δεσμός ημιακετάλης (και κυκλοποίηση) και ακετάλης (και δημιουργία ενός δισακχαρίτη)

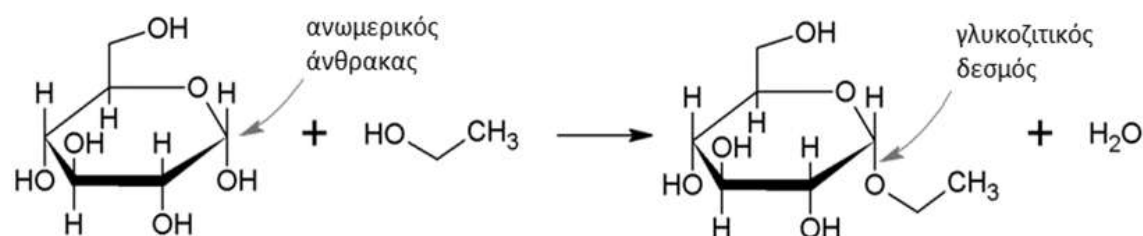
Όταν δύο σάκχαρα (μονοσακχαρίτες) ενώνονται με γλυκοζιτικό δεσμό προκύπτει ένας δισακχαρίτης. (Εικ. 9) Η προσθήκη ενός ακόμη μονοσακχαρίτη δίνει ένα μόριο τρισακχαρίτη, η προσθήκη μερικών ακόμη μονομερών δίνει ολιγοσακχαρίτη, ενώ με την προσθήκη μιας εκτεταμένης σειράς μονομερών έχουμε έναν πολυσακχαρίτη. (4)

Ο γλυκοζιτικός δεσμός μπορεί να υιοθετήσει δυο γεωμετρικά διαφορετικούς προσανατολισμούς, αναφερόμενους ως α- και β-. Σε αυτόν τον διαφορετικό προσανατολισμό του γλυκοζιτικού δεσμού στον χώρο, αποδίδονται οι διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που προσδίδονται στα μόρια π.χ. άμυλου και κυτταρίνης.

1.6. Γλυκοζίτες

Οι γλυκοζίτες είναι ενώσεις που προκύπτουν από την ένωση αναγόντων σακχάρων (γλυκό συστατικό) με άλλα διαφορετικής φύσης ενώσεις (άγλυκα συστατικά). (Εικ. 10) Τα δύο επί μέρους συστατικά συνδέονται προς σχηματισμό των γλυκοζιτών με ακεταλικό ή γλυκοζιτικό υδροξύλιο, ενώ διασπώνται στα συστατικά αυτά με όξινη υδρόλυση. Το συνηθέστερο σάκχαρο στους γλυκοζίτες είναι η γλυκόζη (από την οποία λαμβάνουν και την ονομασία τους), ενώ το άγλυκο συστατικό μπορεί να είναι ουσία ή ομάδα που περιέχει N, S, O κ.α. οπότε ονομάζονται και N-γλυκοζίτες, S-γλυκοζίτες, O-γλυκοζίτες αντίστοιχα. (5)

Οι γλυκοζίτες είναι ενώσεις με ευρύτατη διάδοση και είναι ουσίες με ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον (φαινόλες, φλαβόνες, στερεοειδή, τερπενοειδή κ.α.).



Εικόνα 10. Γλυκοζιτικός δεσμός – Γλυκοζίτης

1.7. Νουκλεοζίτες

Οι νουκλεοζίτες (ή νουκλεοσίδια) αποτελούν θεμελιώδη συστατικά των διαφόρων βιολογικών συστημάτων. Απαντώνται σε όλους τους οργανισμούς στη φύση διότι αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων, των βασικών δομικών μονάδων του γενετικού υλικού, καθώς επίσης και το υπόστρωμα των πολυμερασών για τη σύνθεση DNA και RNA. Ιστορικά, σαν όρος, η ονομασία νουκλεοζίτης, χρησιμοποιήθηκε για την αναφορά δύο ενώσεων, και είναι:

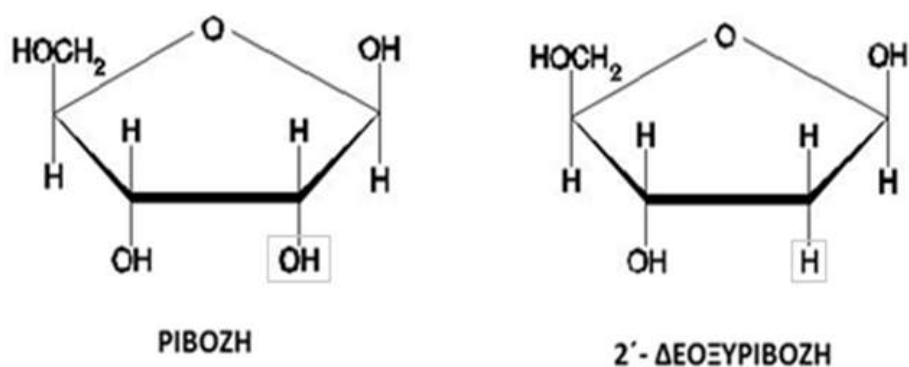
- 2'-δέοξαδενοσίνη, (συστατικό στο DNA) και η
- ουριδίνη (συστατικό στο RNA).

Οι νουκλεοζίτες είναι γλυκοσυλαμίνες που προέρχονται από την ένωση μιας νουκλεοβάσης (αδενίνη, γουανίνη, κυτοσίνη, θυμίνη, ουρακίλη) και της ριβόζης (ριβονουκλεοζίτες) ή της δεοξυριβόζης (δεοξυριβονουκλεοζίτες). Ο όρος αναφέρεται στην ένωση που αποτελείται από δυο μέρη, από μια βάση πουρίνης ή πυριμιδίνης ενωμένη στη θέση 1' μιας πεντόζης με β-N-γλυκοζιτικό δεσμό. (Εικ. 11)



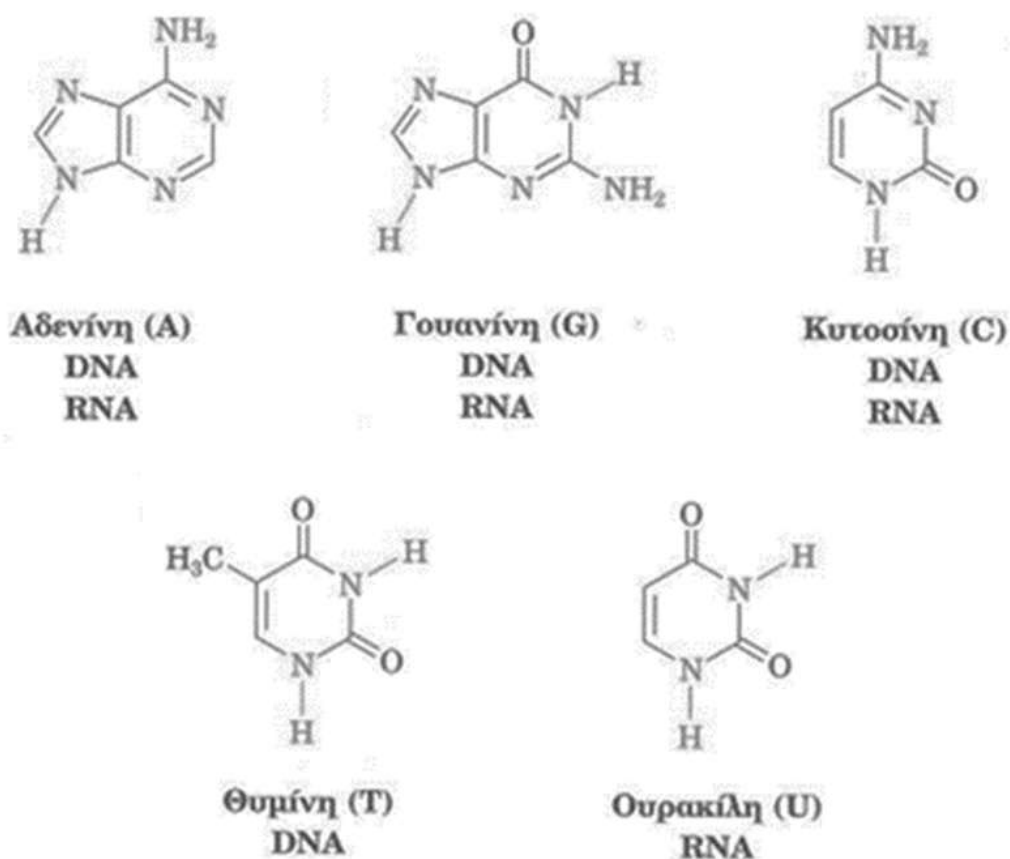
Εικόνα 11. Γλυκοζιτικός δεσμός - Νουκλεοζίτης

Οι Ν-γλυκοζιτικοί δεσμοί σε όλα τα φυσικά μακρομόρια έχουν στερεοδιάταξη β, δηλαδή η βάση βρίσκεται πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου του σακχάρου. (6) Τα σάκχαρα των RNA, DNA, είναι η ριβόζη και η 2-δεοξυριβόζη, αντίστοιχα. (Εικ.12)



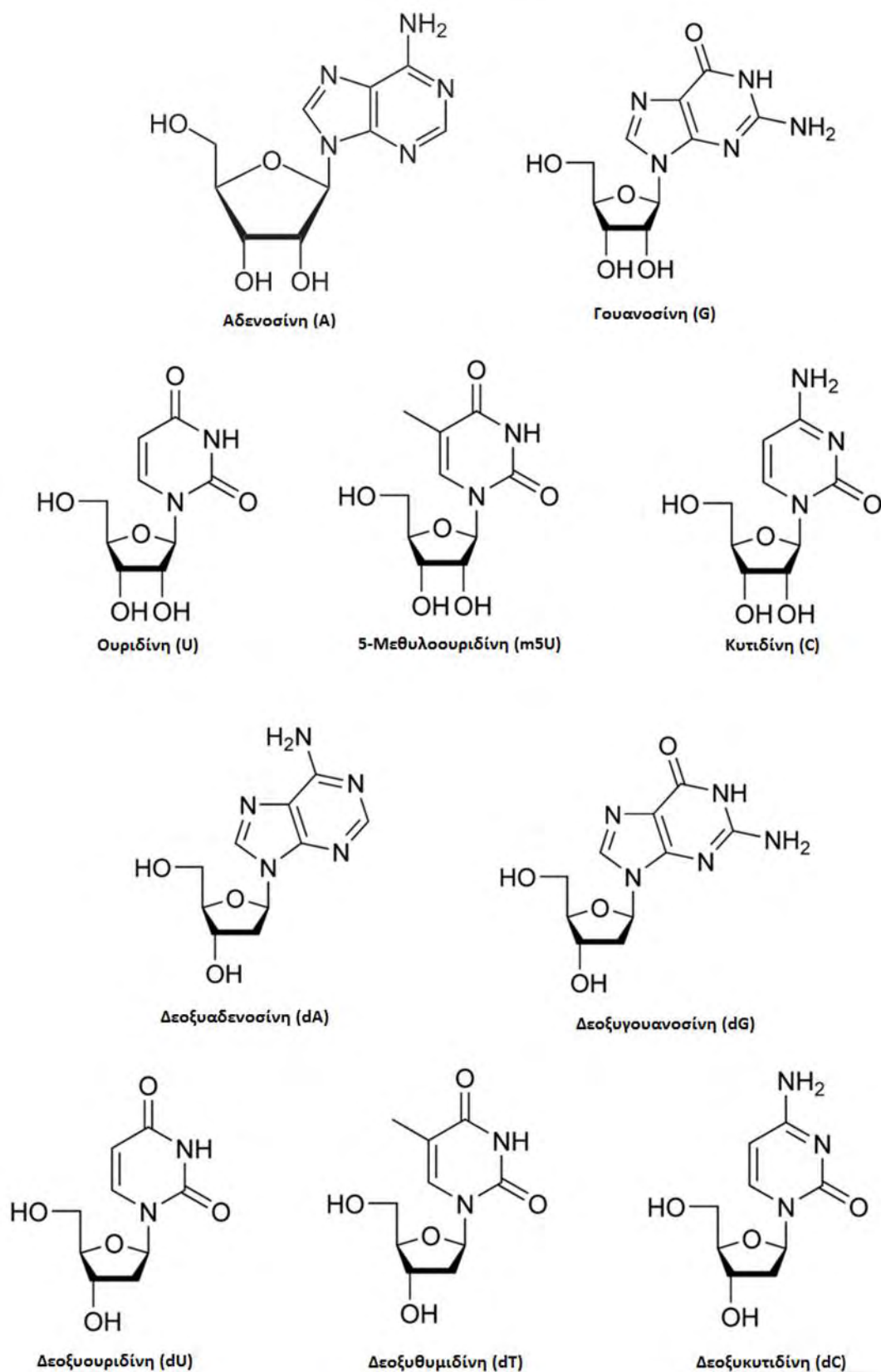
Εικόνα 12. Ριβόζη και 2'-δεοξυριβόζη. (RNA, DNA)

Οι αζωτούχες βάσεις του DNA, και του RNA, παρουσιάζονται κάτω (Εικ.13)



Εικόνα 13. Πουρίνες και Πυριμιδίνες σε RNA, DNA

Οι νουκλεοζίτες του DNA, RNA, παρουσιάζονται στην επόμενη εικόνα (Εικ. 14):



Εικόνα 14. RNA και DNA νουκλεοζίτες.

1.8. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες

Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες είναι μια κατηγορία τεχνητών χημικών μορίων παρόμοιας δομής με τους φυσικούς νουκλεοζίτες και με την τροποποίηση να λαμβάνει χώρα είτε στο τμήμα του σακχάρου, είτε στο τμήμα της βάσης. Τα νουκλεοζιτικά ανάλογα έχουν σημαντική θέση στην φαρμακευτική ως δραστικές ουσίες για την αντιμετώπιση ευρέως φάσματος νοσημάτων.

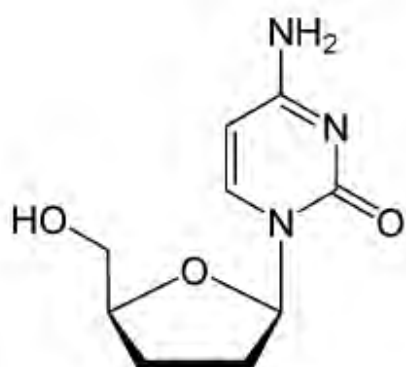
Εδώ και μισό αιώνα περίπου πολλά αντιϊκά και αντικαρκινικά φάρμακα βασίζονται σε δραστικές ουσίες που είναι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες. Τόσο, στην αντιμετώπιση του ιού HIV, που το τελευταίο του στάδιο είναι το AIDS, όσο και στην αντιμετώπιση της λευχαιμίας και άλλων μορφών καρκίνου, οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες αποτελούν κύριες επιλογές ως θεραπευτικά σκευάσματα.

Οι νουκλεοζίτες και τα τροποποιημένα ανάλογά τους έχουν αποτελέσει αντικείμενο έντονης μελέτης διότι επιδεικνύουν πολύ ενδιαφέρουσες αντικαρκινικές, αντιικές, αντιοξειδωτικές και αντιυπεργλυκαιμικές ιδιότητες. (7) (8) Το ενδιαφέρον για την όσο το δυνατό καλύτερη κατανόηση της σχέσης δομής-δράσης των νουκλεοζιτών έχει ενταθεί με σκοπό την δημιουργία ισχυρότερων αναλόγων και επέκτασης της του φάσματος των πιθανών θεραπευτικών εφαρμογών τους.

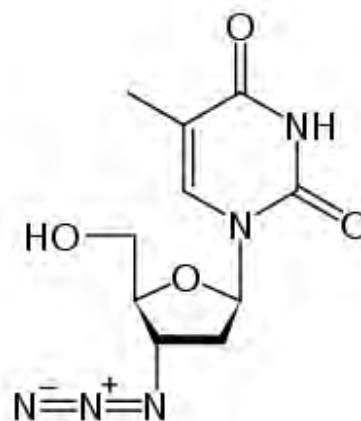
1.8.1. Νουκλεοζίτες ως αντιϊικοί παράγοντες

Οι νουκλεοζίτες και τα ανάλογά τους παρεμβαίνουν στους αντιγραφικούς και μεταγραφικούς μηχανισμούς πολλαπλασιασμού των ιών. Παρέχουν έτσι ένα αρκετά ενδιαφέρον σημείο εκκίνησης για την ανάπτυξη αντιϊκών φαρμάκων (9)(10)(11)(12)(13). Ήδη πολλά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούνται στην ιατρική έναντι ιών όπως το ιού που προκαλεί το AIDS (HIV), του ιού της ηπατίτιδας Β (HBV), των ερπητοϊών (HSV 1-2), του κυτταρομεγαλοϊού (CMV) και του ιού του έρπητα ζωστήρα (VZV). Στην περίπτωση του HIV ανάμεσα στα νουκλεοζιτικά ανάλογα που χρησιμοποιούνται θεραπευτικά είναι (Εικ. 15):

- ddC, AZT,

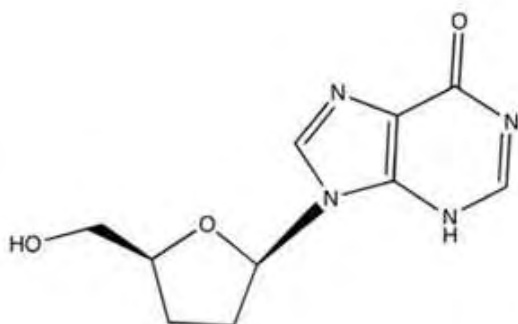


Zalcitabine (2'-3'-
dideoxycytidine, **ddC**)

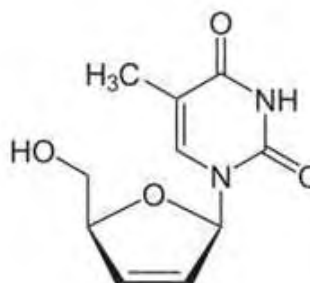


Zidovudine (INN) or
azidothymidine (**AZT**)
(also called ZDV)

- ddl, d4T,

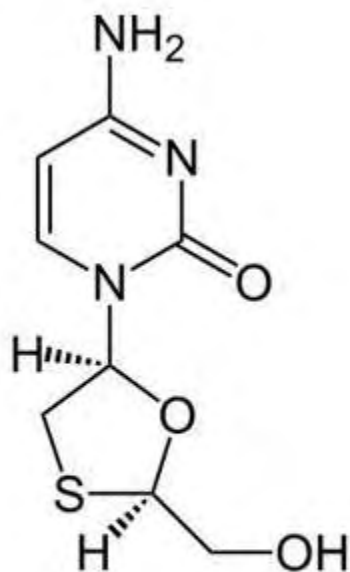


Didanosine (2',3'-
dideoxyinosine, **ddl**,
DDI)

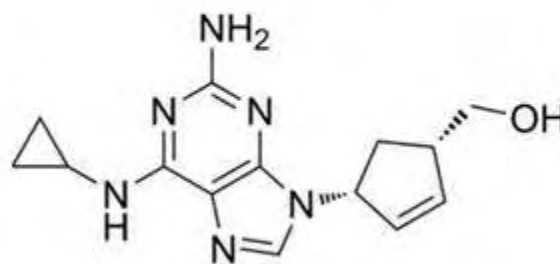


Stavudine (2'-3'-
didehydro-2'-3'-
dideoxythymidine, **d4T**)

- abacavir και 3TC



Lamivudine (2',3'-
dideoxy-3'-thiacytidine,
commonly called **3TC**)

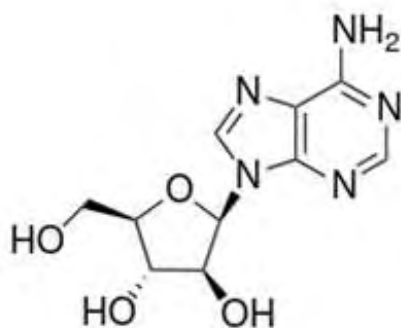


Abacavir (ABC)

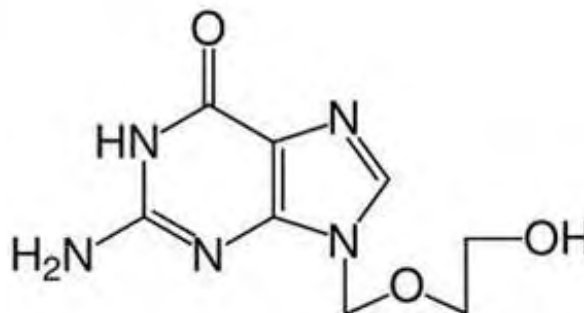
Εικόνα 15. ddC, AZT, ddl, d4T, 3TC και ABC

που δρουν ως αναστολείς της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού. Για τον ιό HBV έχει ήδη εγκριθεί στην Αμερική και χρησιμοποιείται το 3TC σε συνδυασμό με ιντερφερόνη-α. Για τον CMV, τον HSV 1 και 2 και τον VZV χρησιμοποιείται πλήθος νουκλεοζιτικών αναλόγων, (Εικ. 16), όπως

- βιδαραβίνη, ακυκλοβίρη,

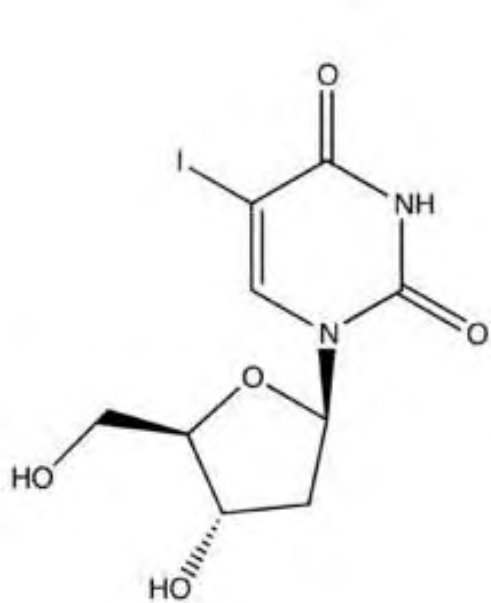


Vidarabine or 9-β-D-
arabinofuranosyladenine
(ara-A)

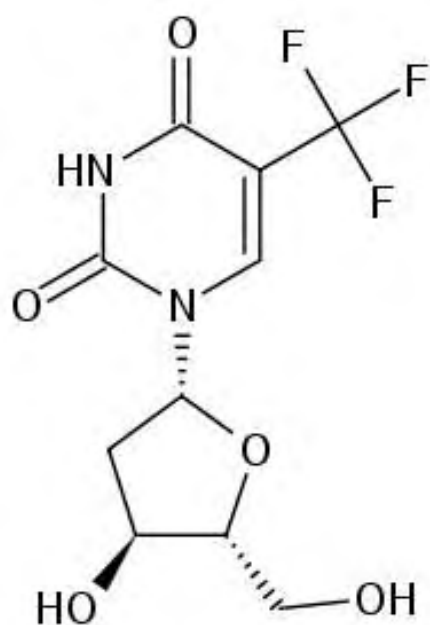


Aciclovir or acyclovir,
acycloguanosine,
abbreviated as **ACV**

- ιδοξουριδίνη, τριφλουριδίνη,

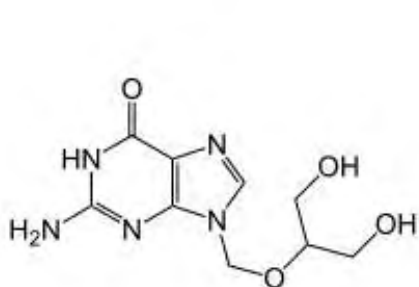


Idoxuridine

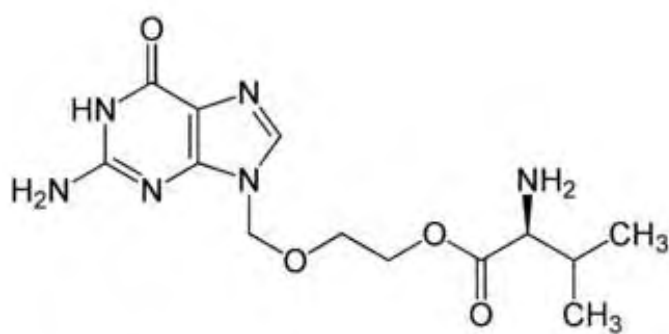


Trifluridine
trifluorothymidine
(TFT)

- γανσικλοβίρη, βαλακυκλοβίρη και άλλα. (14)



Ganciclovir or DHPG



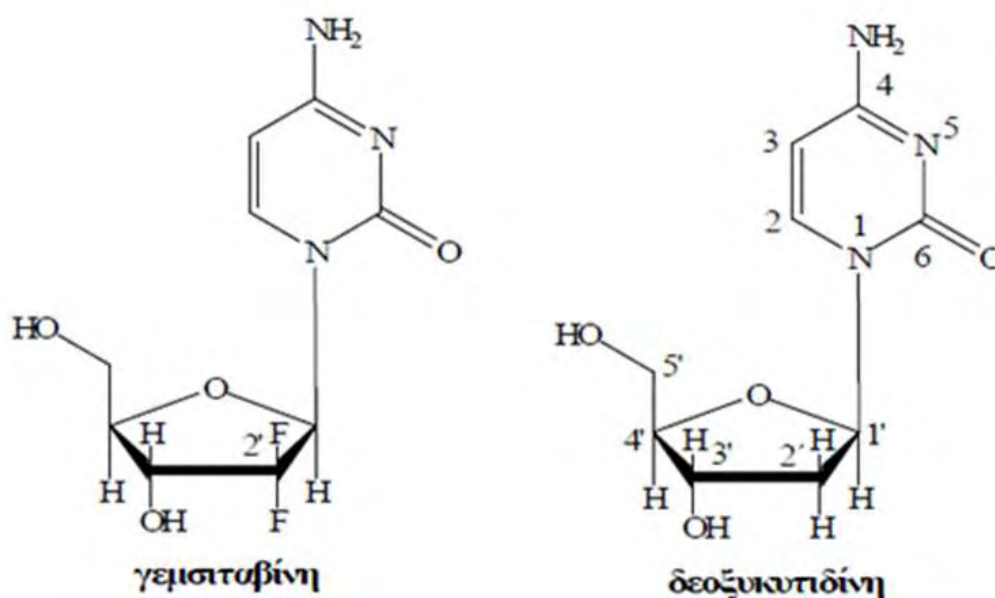
Valaciclovir or valacyclovir

Εικόνα 16. Ara-A, ACV, Idoxurine, TFT, DHPG, Valacyclovir

1.8.2. Νουκλεοζίτες ως αντί-καρκινικοί παράγοντες

Έχει τεκμηριωθεί από έρευνες, ότι πολλοί τροποποιημένοι νουκλεοζίτες παρουσιάζουν ισχυρή φαρμακευτική δράση ενάντια στον καρκίνο. Εδώ και χρόνια, κυκλοφορούν στην παγκόσμια αγορά πολλά φάρμακα που η δραστική τους ουσία είναι ένας νουκλεοζίτης, όπως για παράδειγμα το σκεύασμα με το εμπορικό όνομα Gemzar® που χρησιμοποιείτε στην χημειοθεραπεία κατά του καρκίνου (μαστού, παγκρέατος, πνευμόνων και ωοθηκών).

Η δραστική του ουσία είναι ανάλογο νουκλεοζίτη της δεοξυκυτιδίνης, ονομάστηκε gemcitabine, (Εικ. 17) (15) (16) ανακαλύφθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980, και παρουσιάζει επιβεβαιωμένα ισχυρή αντικαρκινική δράση.



Εικόνα 17. Gemcitabine (ανάλογο της δεοξυκυτιδίνης)

Η Γεμισιταβίνη (ή dFdC) είναι αντιμεταβολίτης της πυριμιδίνης και μεταβολίζεται ενδοκυτταρικά από νουκλεοτιδικές κινάσες σε ενεργά διφωσφορικά (dFdCDP) και τριφωσφορικά (dFdCTP) νουκλεοτίδια. Η κυτταροτοξική δράση της γεμισιταβίνης οφείλεται στην αναστολή της σύνθεσης του DNA μέσω δύο μηχανισμών δράσης των dFdCDP και dFdCTP. Η αναστολή σύνθεσης DNA σταματά την ανάπτυξη κυττάρων και οδηγεί σε κυτταρικούς θανάτους. (17)

Η συνηθέστερη χρήση της γεμισταβίνης είναι σε συνδυασμό με την καρβοπλατίνη στη λεγόμενη χημειοθεραπεία «GemCarbo» κυρίως για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα. (18)

Η συνδυασμένη χημειοθεραπεία χρησιμοποιείται για την μέγιστη αποτελεσματικότητα, την διεύρυνση του θεραπευτικού εύρους, και την μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών.

1.8.2.1. Αντινεοπλασματικά και αντικαρκινικά φάρμακα

Γενικά, τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα δημιουργούν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες που μεταξύ άλλων είναι η στείριότητα, η καρδιοτοξικότητα, η καταστολή του μυελού, η νευροπάθεια, η νεφρική ανεπάρκεια, η μυαλγία, η αλωπεκία κ.α.

Στα πλαίσια του σχεδιασμού και της ανάπτυξης νέων χημειοθεραπευτικών μέσων, γίνονται προσπάθειες βελτίωσης της εκλεκτικότητας τους και ως εκ τούτου μείωσης των ανεπιθύμητων ενεργειών τους.

Μια από τις σημαντικότερες προσπάθειες αφορά στην εκλεκτική μεταφορά των κυτταροτοξικών παραγόντων στα καρκινικά κύτταρα η οποία επιτυγχάνεται διαμέσου ποικίλων στρατηγικών:

- με προφάρμακα που ενεργοποιούνται από ενδογενή ένζυμα τα οποία εντοπίζονται κυρίως στα καρκινικά κύτταρα,
- με εξειδικευμένα εξωγενή ένζυμα τα οποία εισάγονται εντός των κυτταρικών ιστών μέσω γενετικής τεχνολογίας, και
- με σύζευξη αντινεοπλασματικών παραγόντων με χημικές δομικές ομάδες που δύνανται να αναγνωρίζουν τα καρκινικά κύτταρα όπως μονοκλωνικά αντισώματα, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, φυλλικό οξύ, υαλουρονικό οξύ και πεπτίδια.

Τα αντικαρκινικά φάρμακα διαχωρίζονται ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους σε:

- φάρμακα που συνδέονται ομοιοπολικά με το DNA,
- αντιμεταβολίτες,
- φάρμακα που συνδέονται μη ομοιοπολικά με το DNA,
- αναστολείς των μικροσωληνίσκων,
- αναστολείς της DNA τοποϊσομεράσης I και II,
- φάρμακα που επιδρούν στη λειτουργία του ενδοκρινούς συστήματος, και
- στους παράγοντες διαφοροποίησης.

Οι αντιμεταβολίτες έχουν δομή που μοιάζει με τους φυσιολογικούς μεταβολίτες που είναι απαραίτητοι για την δομή και τη λειτουργία του κυττάρου. Ενσωματώνονται σε νεοσχηματιζόμενο υλικό του πυρήνα ή ανταγωνίζονται ουσιώδη ένζυμα παραβιάζοντας έτσι την κυτταρική λειτουργία και διαίρεση. Η μέγιστη κυτταροτοξική τους δράση είναι ειδική για τη φάση S (σύνθεση DNA), και επομένως, οι αντιμεταβολίτες είναι ειδικοί για τον κυτταρικό κύκλο.

Οι αντιμεταβολίτες, ανάλογα με την δομή τους δύνανται να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες:

- a) ανταγωνιστές του φυλλικού οξέος
- b) ανάλογα της πυριμιδίνης
- c) ανάλογα της πουρίνης, και
- d) ανάλογα τροποποιημένων σακχάρων.

Το παράδειγμα της γεμισταβίνης αντιστοιχεί σε αντιμεταβολίτη της d κατηγορίας, δηλ. ένα ανάλογο τροποποιημένου σακχάρου ενός νουκλεοζίτη. (19)

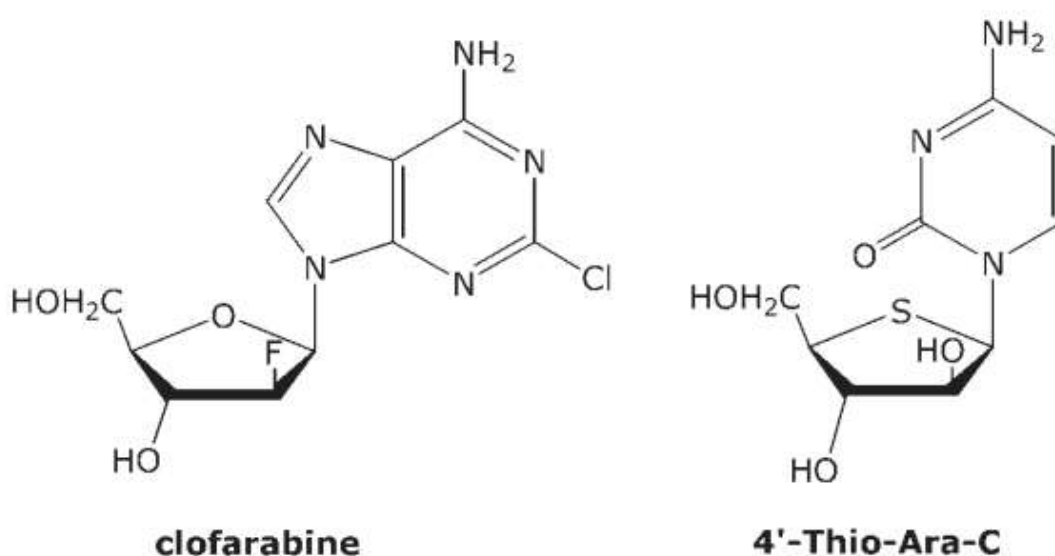
1.8.2.2. Τροποποιημένοι νουκλεοζίτες στην θεραπεία του καρκίνου

Η αναγνώριση των αντικαρκινικών και κυτταροστατικών ιδιοτήτων των νουκλεοζιτικών αναλόγων τους, αποτελούν αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Ήδη, από το 1950 ως το 1980 τα νουκλεοζιτικά ανάλογα, χρησιμοποιήθηκαν εκτεταμένα στην θεραπεία διάφορων μορφών του καρκίνου, αλλά ακόμη και σήμερα αποτελούν επιλογές πρώτης γραμμής για την φαρμακευτική αντιμετώπιση κατά μίας πλειάδας μορφών νεοπλασιών.

Από τότε που πρώτο-χρησιμοποιήθηκαν μέχρι και σήμερα, οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες άλλες φορές βρισκότανε στο παγκόσμιο επιστημονικό επίκεντρο, και άλλες φορές όχι, για δύο κυρίως λόγους:

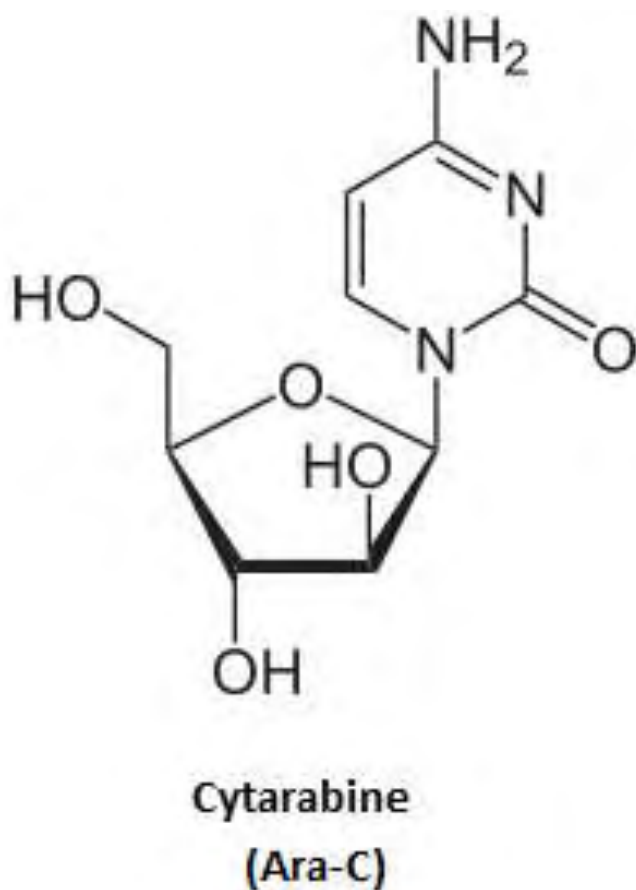
1. Ανησυχίες σχετικά με την τοξικότητα των νουκλεοζιτικών αναλόγων
2. Ανησυχίες ότι ίσως τα νέα νουκλεοζιτικά ανάλογα να μην είναι ικανοποιητικώς διαφορετικά από αυτά που ως τώρα γνωρίζουμε και έχουν εγκριθεί για τους ανθρώπους και άρα το πιο πιθανό είναι να μην αποτελούν εξέλιξη.

Συμπερασματικά όμως, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα συνεχίζουν και παραμένουν εξαιρετικοί υποψήφιοι ως αντί-καρκινικοί παράγοντες όπως το clofarabine και το 4'-Thio-ara-C. (Εικ. 18) (20)



Εικόνα 18. Clofarabine, 4'-Thio-Ara-C

Επίσης, νέα μόρια βασίζονται σε παλαιότερους και γνωστούς αντιμεταβολίτες, όπως την cytarabine, Ara - C (Εικ. 19) που έχει επιδείξει άριστες κυτταροστατικές ιδιότητες έναντι διαφόρων τύπους λεμφωμάτων και λευχαιμίας. (21)(22)



Εικόνα 19. Ara-C.

Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει επίσης την ικανότητα αναλόγων των νουκλεοζιτών να ενεργοποιούν αποπτωτικούς μηχανισμούς σε ένα εύρος καρκινικών κυτταρικών σειρών, αποδεικνύοντας περαιτέρω την χρησιμότητά τους ως αντικαρκινικοί παράγοντες. (23)(24)

1.8.3. Τρόπος δράσης των τροποποιημένων νουκλεοζιτών

Οι φυσικοί νουκλεοζίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά και αποτελούν πρόδρομες ενώσεις των νουκλεοτιδίων των νουκλεϊκών οξέων. Ως γνωστό, τα νουκλεϊκά οξέα είναι ακολουθίες πολυνουκλεοτιδίων. (Εικ. 20) Σε μια τέτοια μεγάλη ακολουθία μορίων που απαρτίζει ένα νουκλεϊκό οξύ αυτό που ουσιαστικά διαφοροποιείται είναι μόνο η βάση εκάστοτε μόνονουκλεοτιδίου αφού το υπόλοιπο μόριο είναι πάντοτε το ίδιο. Η συνένωση δύο νουκλεοτιδίων γίνεται με εστεροποίηση της ελεύθερης φωσφορικής ρίζας του ενός νουκλεοτιδίου με μια αλκοολομάδα του σακχάρου του άλλου νουκλεοτιδίου. Ο δεσμός αυτός ονομάζεται «3'–5' φωσφοδιεστερικός δεσμός». Με τη σύνδεση αυτή μένει ελεύθερη μία [-OH] ομάδα του φωσφορικού οξέος που έχει $K_a=2$, γι' αυτό και οι ενώσεις αυτές χαρακτηρίστηκαν σαν οξέα.



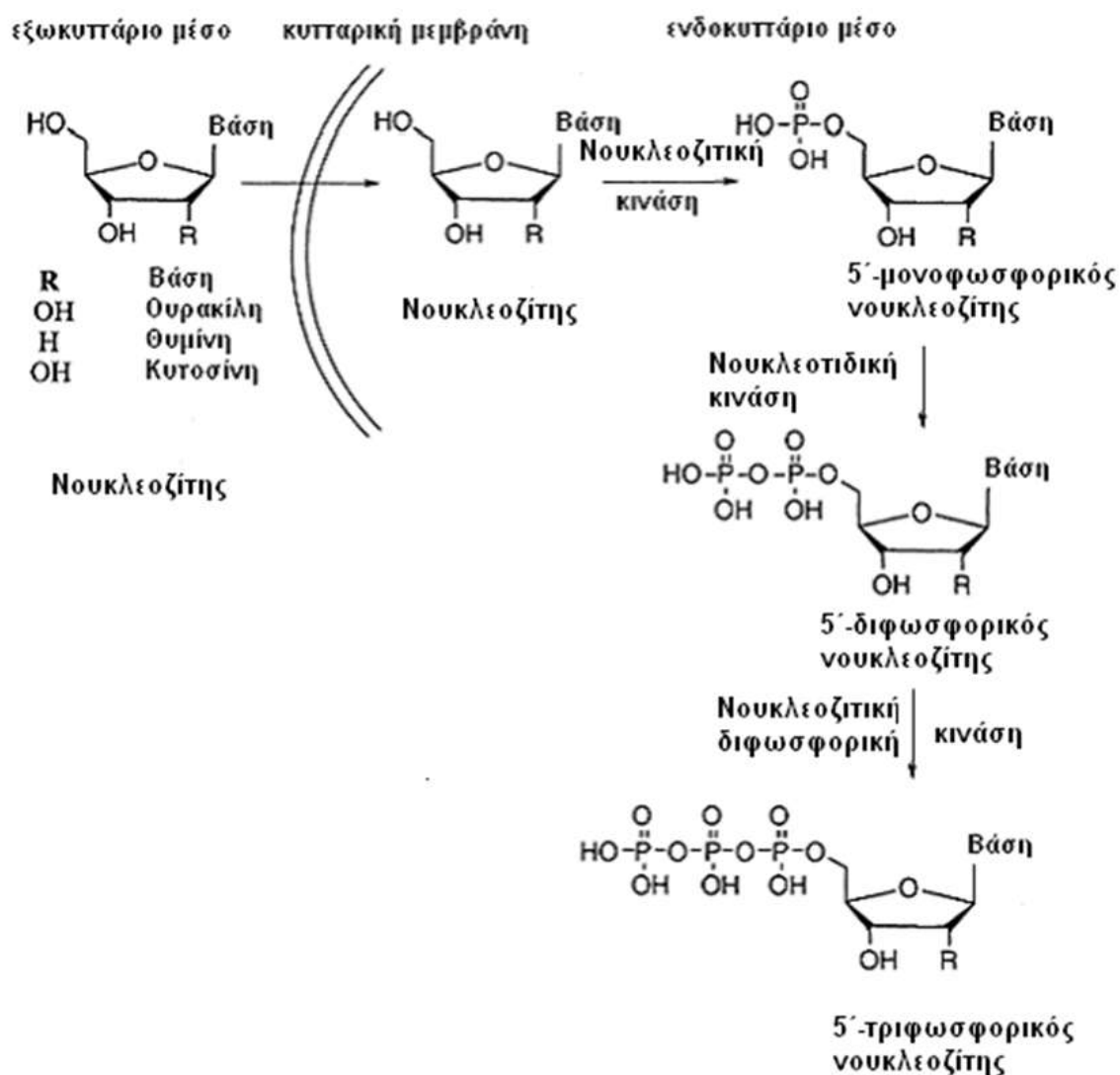
Εικόνα 20. Ακολουθία νουκλεοτιδίων

Ο γενικός μηχανισμός της δράσης των φαρμάκων στηρίζεται στην αλληλεπίδρασή τους με ένα μοριακό στόχο, ο οποίος μπορεί να είναι είτε κάποια πρωτεΐνη, όπως ένας υποδοχέας, ένας διάυλος ιόντων, ένα ένζυμο, ένα μόριο μεταφορέας, είτε τα νουκλεϊκά οξέα. (25)

Στην φύση οι νουκλεοζίτες συντίθενται ενδοκυτταρικά αλλά είναι δυνατή και η είσοδός τους στο κύτταρο δια της παθητικής διάχυσης όπως επίσης και μέσω πρωτεϊνών μεταφορέων νουκλεοζιτών, ιδιότητες τις οποίες εκμεταλλευόμαστε στην χρήση νουκλεοζιτικών αναλόγων ως αντικαρκινικά και αντιϊικά φάρμακα.

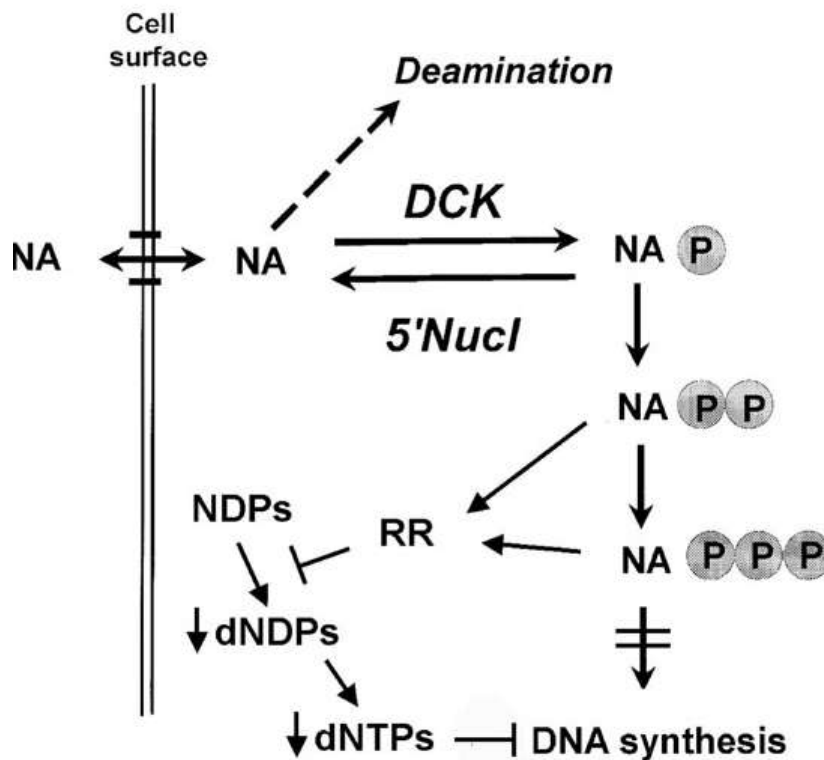
Οι τροποποιημένοι νουκλεοζίτες ως δραστικές ουσίες αποτελούν το είδος των ανενεργών προ-φαρμάκων, αφού προκειμένου να γίνουν δραστικά απαιτείται η μεταφορά του με μεταφοράσες ή την παθητική διάχυση και η αλληλεπίδραση του με τον στόχο.

Για να ασκήσουν την θεραπευτική τους δράση, χρειάζεται να μεταβολιστούν προς τις ενεργές τριφωσφορυλιωμένες μορφές τους (26). (Εικ. 21)



Εικόνα 21. Τρόπος δράσης νουκλεοζιτικών αναλόγων

Οι φωσφορυλιωμένες μορφές των νουκλεοζιτών δεν μπορούν να διαπεράσουν με ευκολία την κυτταρική μεμβράνη λόγω φορτίου, όπως επίσης και άπαξ και δημιουργηθούν μέσα στο κύτταρο η μετακίνησή τους προς γειτονικά κύτταρα είναι δύσκολη λόγω του διαφορετικού pH που υπάρχει στα διάφορα κυτταρικά διαμερίσματα.

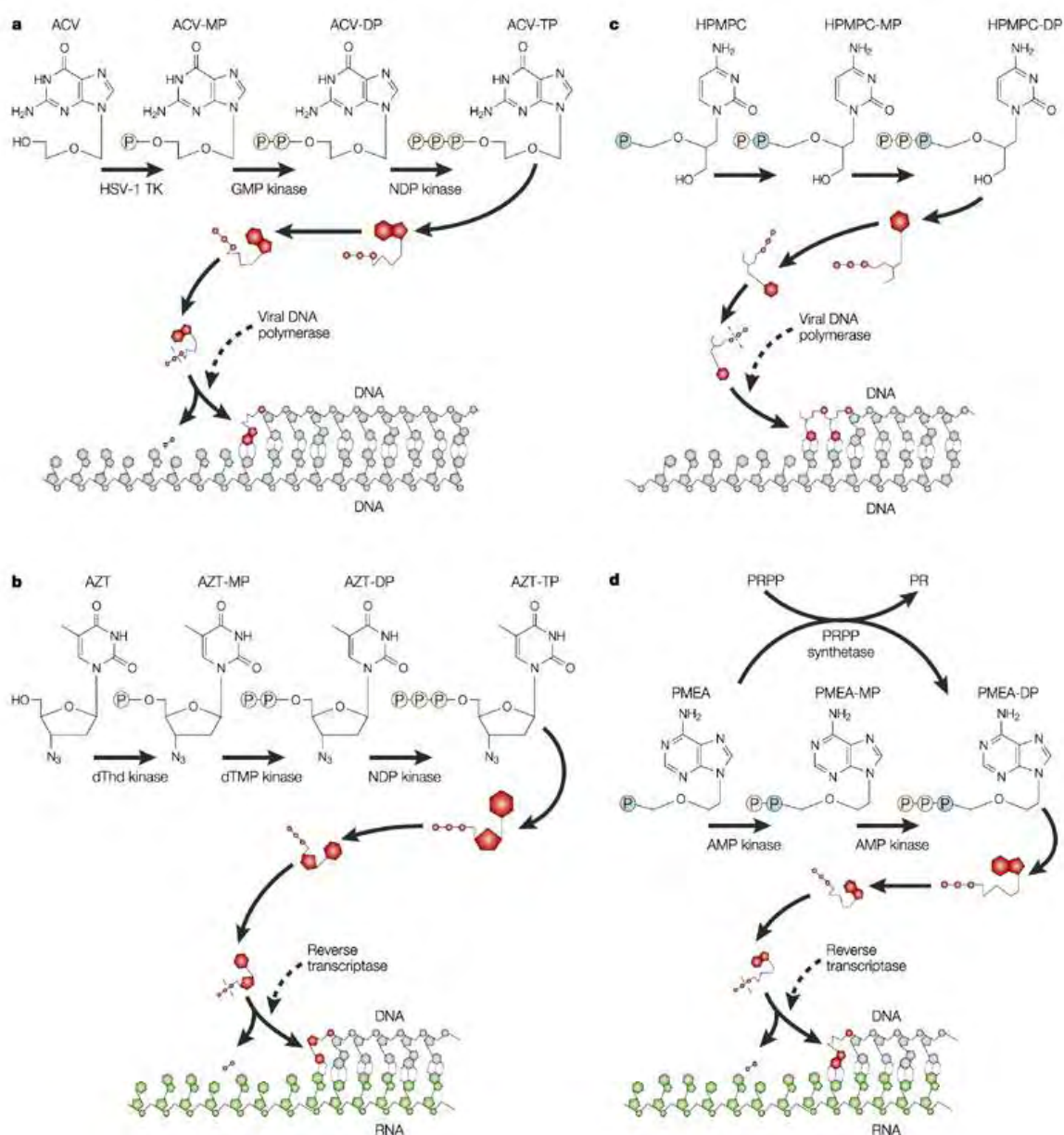


Εικόνα 22. Νουκλεοζιτικά ανάλογα. Μηχανισμός δράσης και παρεμπόδιση

Στην εικόνα 22 παρουσιάζεται σχηματικά ο μεταβολισμός και οι αλληλεπιδράσεις του στόχου και αναλόγου δεοξυριβονουκλεοζίτη σε πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα. Το νουκλεοζιτικό ανάλογο (NA) εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ειδικών νουκλεοζιτικών μεταφοράσεων. Μόλις βρεθεί στο εσωτερικό του κυττάρου, το NA φωσφορυλιώνεται από την κινάση δεοξυκυτιδίνης (DCK), NMPK και NDPK προς τα δραστικά 5'-τριφωσφορικά παράγωγα. Ο καταβολισμός του NA μπορεί να προκύψει από την ταχεία απαμίνωση από την απαμινάση κυτιδίνης προς μη τοξικούς μεταβολίτες. Η δραστηριότητα από την κυτταροπλασματική 5'-νουκλεοτιδάση (5'NucI) αντιτίθεται με εκείνης του DCK με αποφωσφορυλιώσεις 5'-μονοφωσφορικών παραγώγων, αποτρέποντας έτσι την παραγωγή της δραστικής μορφής. Το NA ασκεί την δραστηριότητα του με την ενσωμάτωση στο νέο-συντιθέμενο DNA που έχει ως αποτέλεσμα τον τερματισμό της αλυσίδας και τον κυτταρικό θάνατο. Επίσης, μερικά NA μπλοκάρουν έμμεσα την αντιγραφή του DNA μέσω την αναστολής της αναγωγάσης ριβονουκλεοτιδίου (RR) ένζυμου, που με τη σειρά του αναστέλλει τη μείωση των διφωσφορικών ριβονουκλεοτιδίων (NDPs) προς διφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNDPs). Η

μείωση των τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ευνοεί την ενσωμάτωση της δραστικών 5'-τριφωσφορικών παράγωγων στο DNA. (27)

Η δράση των νουκλεοζιτικών αναλόγων έναντι των ιών, εντοπίζεται στην ικανότητά τους να αλληλοεπιδρούν με τις ιικές DNA πολυμεράσες και την αντίστροφη μεταγραφάση. (Εικ. 23)



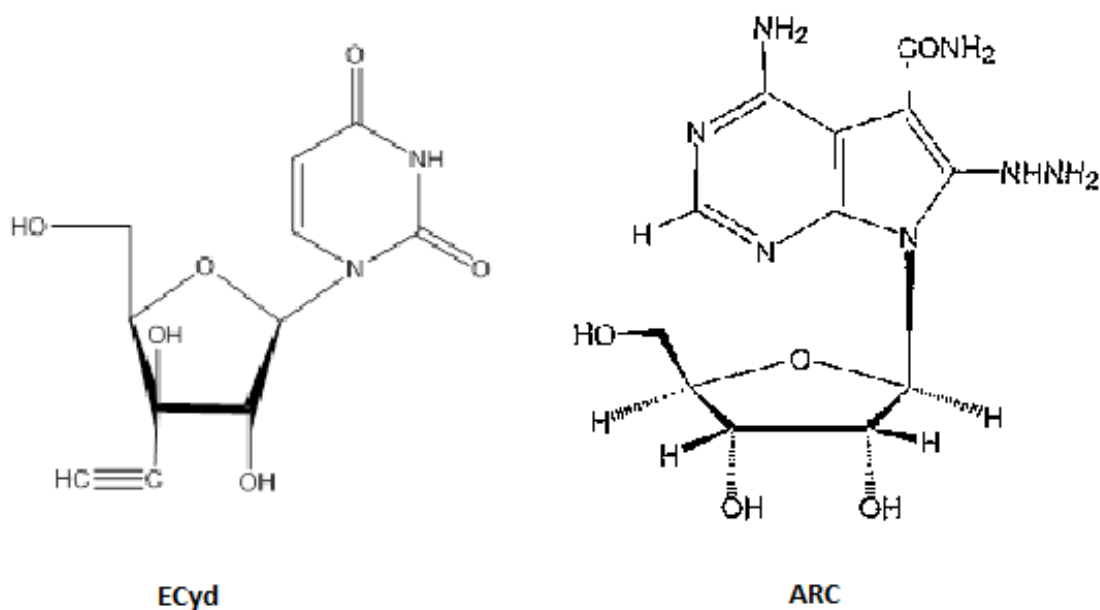
Nature Reviews | Drug Discovery

Εικόνα 23. Παραδείγματα αντιϊκών νουκλεοζιτικών αναλόγων που δρουν με τον μηχανισμό του τερματισμού αλυσίδας – [Hyperlinked image](#) (28)

Μιμούμενα τους φυσικούς νουκλεοζίτες, τα αντιϊκά ανάλογά τους μπορούν να αποτελέσουν υπόστρωμα για τις πολυμεράσες και να ενσωματωθούν στο ιικό γονιδίωμα. Οι ιοί ενσωματώνουν κατά λάθος στο γονιδίωμα τους (*fake DNA building blocks*) κατά την διάρκεια της αντιγραφής. Στη συνέχεια διακόπτεται ο κύκλος ζωής του ιού, αφού οι νεοσυντιθέμενες DNA ακολουθίες είναι ανενεργές και έχει επέλθει ο τερματισμός της αλυσίδας DNA. Αυτό συμβαίνει επειδή αυτά τα νουκλεοζιτικά ανάλογα δεν διαθέτουν τις ομάδες υδροξυλίου, οι οποίες, κανονικά συνδέονται με τις φωσφορικές ομάδες. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος είναι συντηρημένος σε πολλά είδη ιών, τα νουκλεοζιτικά ανάλογα μπορούν να παρουσιάσουν δράση έναντι μεγάλου φάσματος ιών. (29)

Άλλα αντιϊκά νουκλεοζιτικά ανάλογα χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό δράσης όμως ο στόχος τους δεν είναι οι DNA ικές πολυμεράσες, αλλά η αναστολή του ένζυμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase).

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων είναι ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν την διαδικασία της απόπτωσης στα καρκινικά κύτταρα είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω της καταστολής αντιαποπτωτικών γονιδίων. Δυο νουκλεοζιτικά ανάλογα, στα οποία ο τρόπος δράσης τους έχει εντοπιστεί στον παραπάνω μηχανισμό είναι τα ECyd και ARC (30). (Εικ. 24)



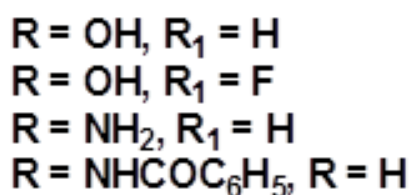
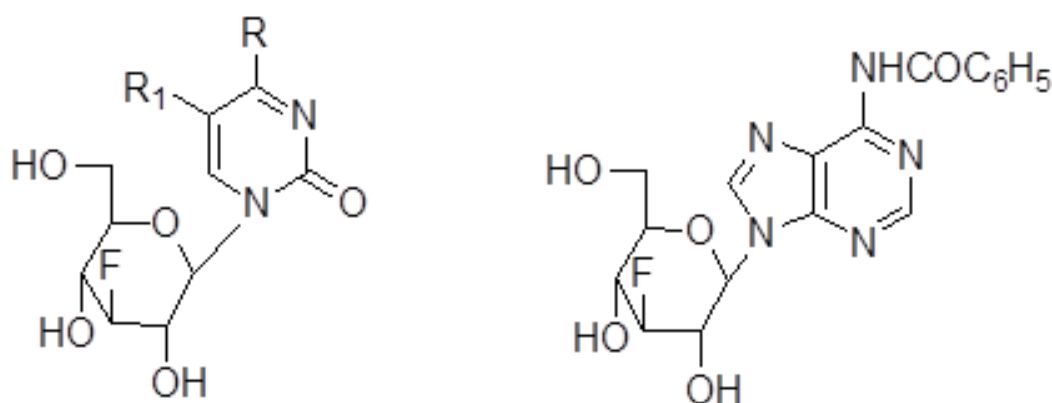
Εικόνα 24. ECyd και ARC

1.9. Πυρανονουκλεοζίτες

Μεγάλη προσπάθεια στην έρευνα για την ανάπτυξη αντικαρκινικών και αντιϊκών νουκλεοζιτών επικεντρώθηκε στην σύνθεση και μελέτη νουκλεοζιτικών αναλόγων που έφεραν ως σάκχαρο μια πεντόζη. Η χρήση πεντοζών ως σάκχαρο των νουκλεοζιτικών αναλόγων αποδείχθηκε προβληματική για μια πλειάδα λόγων. Οι φουρανονουκλεοζίτες παρουσίαζαν περιορισμένη δράση ως φάρμακα διότι υφίστανται χημική ή ενζυματική απενεργοποίηση σχετικά εύκολα, δεν μεταβολίζονται επαρκώς προς τις ενεργές τριφωσφορικές δομές τους, παρουσιάζουν μικρό χρόνο ημιζωής και τοξικότητα.

Ένα άλλο αρκετά σημαντικό πρόβλημα είναι η εμφάνιση νέων ανθεκτικών ιών και καρκινικών κυττάρων προς αυτές τις ενώσεις. Έτσι, το ερευνητικό ενδιαφέρον στράφηκε σε πυρανονουκλεοζίτες, δηλαδή νουκλεοζίτες που φέρουν ως σάκχαρο μια εξόζη. Έδω αρκετοί πυρανονουκλεοζίτες αξιολογούνται όσον αφορά την βιολογική τους δράση και έχουν επιδείξει αντικές και αντικαρκινικές ιδιότητες.

Για παράδειγμα, οι φθοριωμένοι πυρανονουκλεοζίτες (Εικ. 25) (31), οι οποίοι μειώνουν αποτελεσματικά τη δραστικότητα της PARN, ένα ένζυμο-κλειδί στην αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής ουράς (πολύ(A) ουράς)



Εικόνα 25. Φθόριο-πύρανο-νουκλεοζίτες

2.0. Θειοπουρίνες

Οι θειοπουρίνες είναι μια κατηγορία χημικών ενώσεων με αξιόλογη φαρμακευτική δράση ως αντικαρκινικοί παράγοντες. Είναι αντιμεταβολίτες αναλόγων πουρινών, και η οικογένεια των θειοπουρίνων περιλαμβάνει την 6-Θειογουανίνη (6-thioguanine, 6-TG), την 6-Μερκαπτοπουρίνη (6-mercaptopurine, 6-MP) και την Αζαθειοπρίνη (Azathioprine, AZA). (32)

Τα φάρμακα θειοπουρίνων χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, για αυτοάνοσες διαταραχές (π.χ., νόσος του Crohn και ρευματοειδή αρθρίτιδα) και σε λήπτες μεταμόσχευσης οργάνων.

Η 6-θειογουανίνη και η 6-μερκαπτοπουρίνη, συντέθηκαν από τους Hitching και Elion, στο Wellcome Research Laboratories, το 1955 και το 1954, αντίστοιχα. Και τα δύο φάρμακα είναι εγκεκριμένα από τον FDA, και σήμερα κατασκευάζονται από την DSM Pharmaceuticals, Inc. για λογαριασμό την GlaxoSmithKline με τα εμπορικά ονόματα μεταξύ άλλων, Lanvis® και Purinethol®, για την θειογουανίνη και την μερκαπτοπουρίνη, αντίστοιχα. (Εικ. 26)



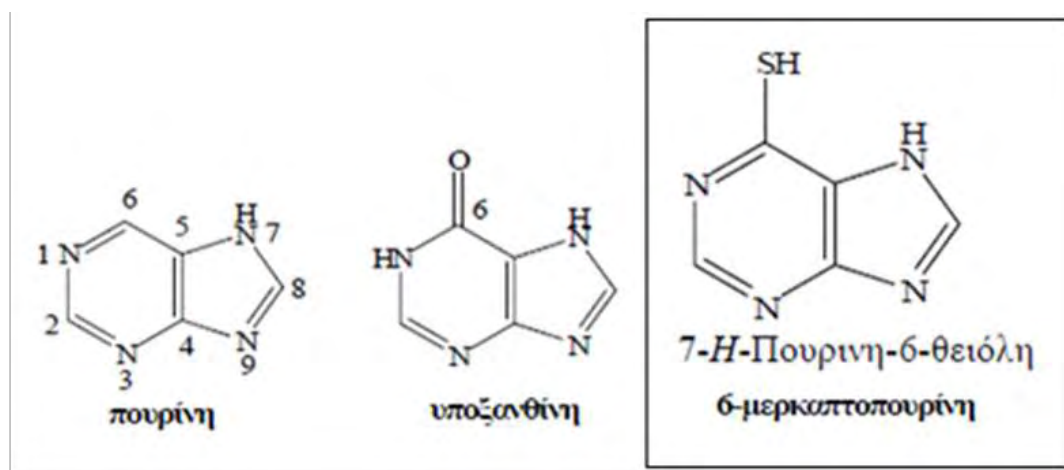
Εικόνα 26. Lanvis, Purinethol

Οι θειοπουρίνες, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη θεραπεία κακοηθειών, ρευματικών παθήσεων, δερματολογικών παθήσεων, φλεγμονώδης εντερικές παθήσεις, και για την αποφυγή της απόρριψης μεταμόσχευσης οργάνου. Ωστόσο, τα φάρμακα έχουν ένα σχετικά στενό θεραπευτικό εύρος και είναι ικανά να προκαλέσουν απειλητική τοξικότητα για τη ζωή, συχνότερα μυελοκαταστολή. (33)(34)

2.1. 6-Μερκαπτοπουρίνη (6-MP)

Η 6-Μερκαπτοπουρίνη (6-MP) είναι ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας με ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Παρεμβαίνει στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων αναστέλλοντας τον μεταβολισμό της πουρίνης και χρησιμοποιείται, συνήθως σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα, στην αγωγή ή σε προγράμματα συντήρησης της ύφεσης στην λευχαιμία. (35) Ενδείξεις χρήσης του συγκεκριμένης ουσίας είναι η οξεία μυελογενής, οξεία λεμφική λευχαιμία (ως θεραπεία συντήρησης) και η χρόνια μυελογενής (οξεία φάση).

Η 6-μερκαπτοπουρίνη είναι το θειολικό ανάλογο της υποξανθίνης, (Εικ. 27) και είναι ένα αδρανές προφάρμακο που λειτουργεί ως ανταγωνιστής της πουρίνης που για να εμφανίσει την κυτταροτοξικότητά της απαιτείται η πρόσληψη της από τα κύτταρα και ο ενδοκυττάριος αναβολισμός της σε θειογουανίνη.



Εικόνα 27. 6-μερκαπτοπουρίνη (6-MP)

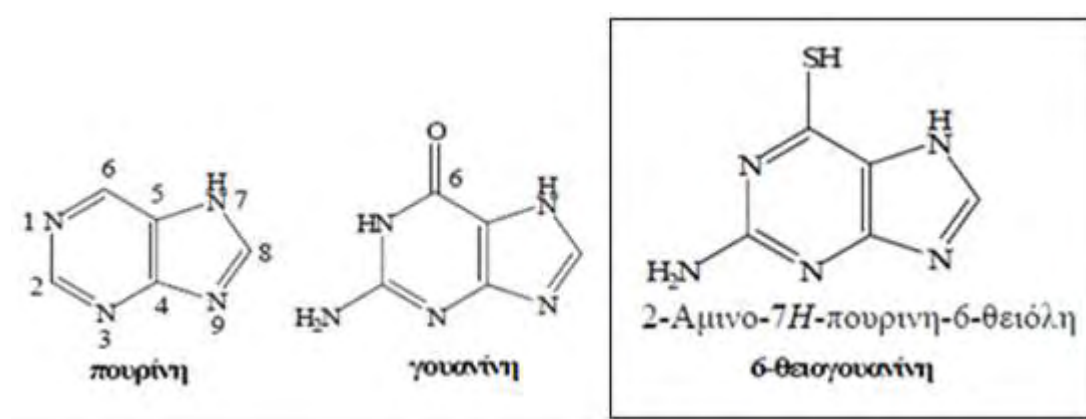
Για να δράσει πρέπει να μετατραπεί στο αντίστοιχο μονοφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο της. Η μετατροπή αυτή καταλύεται από το ένζυμο της φωσφοροριβοζυλικής τρανσφεράσης υποξανθίνης – γουανίνης, ένα ένζυμο που συμμετέχει στην «πορεία περίσωσης» (salvage) για τις πουρίνες.

Το μη φυσιολογικό νουκλεοτίδιο που σχηματίζεται, αναστέλλει με παλίνδρομο μηχανισμό το πρώτο στάδιο της *de novo* βιοσύνθεσης των πουρινών μιμούμενο το μονοφωσφορικό ριβονουκλεοτίδιο της γουανίνης (GMP). Το GMP όπως και το AMP (μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο της αδενίνης) και IMP

(μονοφωσφορικό νουκλεοτίδιο της υποξανθίνης) αναστέλλουν το πρώτο ένζυμο της *de novo* σύνθεσης των πουρινών. Επίσης, τα ανάλογα του γουανυλικού οξέος που παράγονται από τα μη φυσιολογικά νουκλεοτίδια καθιστούν δυσλειτουργικά το DNA ή το RNA στα οποία ενσωματώνονται.

2.2. 6-Θειογουανίνη (6-TG)

Η θειογουανίνη είναι κι αυτή ένας αντινεοπλασματικός παράγοντας που ενδείκνυται στην οξεία μυελογενής και λεμφική λευχαιμία. Η θειογουανίνη είναι σουλφυδριλικό ανάλογο της γουανίνης και λειτουργεί σαν αντιμεταβολίτης της πουρίνης. Διαφέρει από την φυσικά ανευρισκόμενη πουρίνη, τη γουανίνη, κατά το ότι έχει υποκατασταθεί η 6 υδροξυλομάδα με ομάδα θειόλης. (Εικ. 28)



Εικόνα 28. 6-Θειογουανίνη (6-thioguanine, 6-TG)

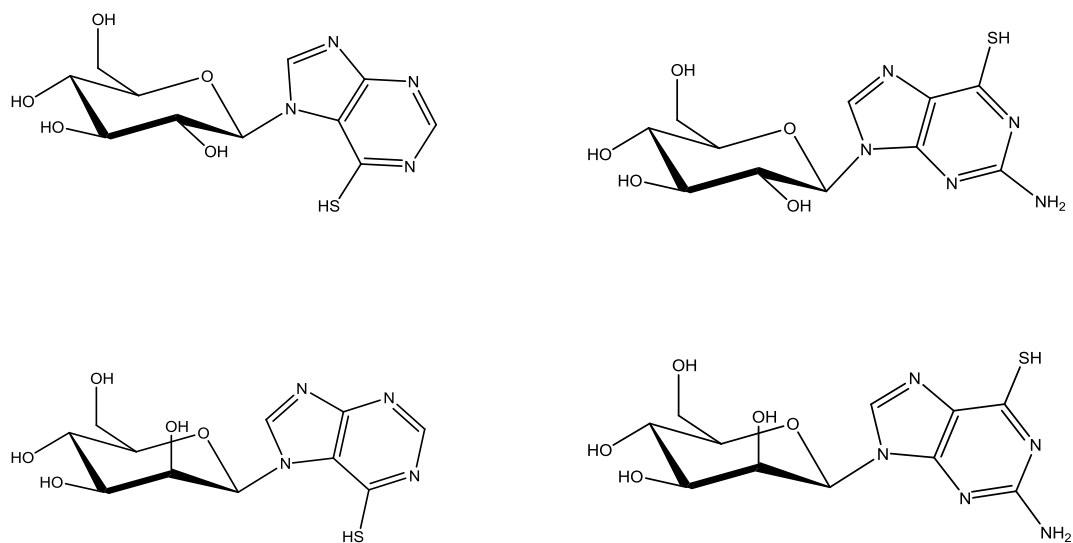
Μπαίνει εύκολα στο κυτταρόπλασμα όπου και μετατρέπεται σε δραστικό νουκλεοτίδιο από το ένζυμο υποξανθινο - γουανινο - φωσφοριβοσυλο - τρανσφεράση. Ο μηχανισμός της δράσης της είναι παρόμοιος με αυτόν της μερκαπτοπουρίνης. Ενεργοποιείται μεταβολιζόμενη στο νουκλεοτίδιο θειογουανιλικό οξύ. Οι μεταβολίτες της θειογουανίνης αναστέλλουν την *de novo* σύνθεση πουρινών και τις εσωτερικές μετατροπές των πουρινονουκλεοτιδίων. Ενσωματώνεται στα πυρηνικά οξέα και η ενσωμάτωση στο DNA είναι υπεύθυνη για την κυτταροτοξικότητά της. Συνήθως υπάρχει διασταυρούμενη αντίσταση μεταξύ θειογουανίνης και μερκαπτοπουρίνης. (36)

3.0. Στόχος – Σκοπός της μελέτης

Η ανάγκη για την εύρεση νέων χημειοθεραπευτικών ουσιών, με αυξημένη βιολογική δράση, ελαττωμένη τοξικότητα και λιγότερες ανοσοκατασταλτικές παρενέργειες καθώς και η ραγδαία και συνεχής ανάπτυξη της φαρμακευτικής χημείας επέτρεψε τη μελέτη, τη σύνθεση και την προώθηση στην αγορά, πληθώρας φαρμάκων που περιέχουν ως δραστική ουσία κάποιο νουκλεοζιτικό ανάλογο.

Βασιζόμενοι στην ενδιαφέρουσα φαρμακολογική δράση της 6-Μερκαπτοπουρίνης και της 6-Θειογουανίνης και στις βιολογικές ιδιότητες των πυρανονουκλεοζιτών θεωρήθηκε ενδιαφέρουσα η σύνθεση και βιολογική αποτίμηση μιας νέας τάξης θειο-πυρανονουκλεοζιτών. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν, στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας η σύζευξη της 6-Μερκαπτοπουρίνης και της 6-Θειογουανίνης με τα σάκχαρα γλυκόζη και μαννόζη και αποτιμήθηκαν ως προς την αντικαρκινική και αντική τους δράση.

Η δομή των μορίων που στόχευσαν οι συνθετικές μας πορείες παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα, ChemDraw object, CDo:



Σχήμα 1. Δομές μορίων έρευνας (ChemDraw object)

3.1. Υλικά και Μεθοδολογία

3.1.1 Υλικά σύνθεσης των νουκλεοζιτικών αναλόγων

Για την σύνθεση των νουκλεοζιτικών αναλόγων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια των παρακάτω εταιριών:

- Οξικός ανυδρίτης (Ac_2O) (Aldrich, Γερμανία)
- Πυριδίνη (Panreac, Ισπανία)
- Διάλυμα Μεθανόλης (MeOH) (Merck, Γερμανία)
- Hexamethyldisilazane (HMDS) (Aldrich, Γερμανία)
- Trimethylsilyltrifluoromethane ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Υδρίδιο του ασβεστίου (CaH) (Fluca, Γερμανία)
- Ακετονιτρίλιο (CH_3CN) (Merck, Γερμανία)
- Πεντοξείδιο του φωσφόρου (P_2O_5) (Alfa Aesar, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bicarbonate (NaHCO_3) (Merck, Γερμανία)
- Κορεσμένο sodium bisulfate (NaHSO_4) (Merck, Γερμανία)
- Άνυδροθειικό νάτριο (Na_2SO_4) (Merck, Γερμανία)

3.2. Γενική Μεθοδολογία

3.2.1. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography), χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αντιδράσεων, της επιβεβαίωσης της μετατροπής και ολοκλήρωσης των αντιδρώντων σε προϊόντα, όπως επίσης και για τον έλεγχο παραπροϊόντων. Χρησιμοποιήθηκαν ειδικές πλάκες αλουμινίου

επιστρωμένες με silica gel της Merck τύπου Kieselgel 60F24. Αυτή η ειδική επίστρωση αποτελεί και την ακίνητη ή στατική φάση.

Η ειδική πλάκα ορθογώνιου σχήματος και διαστάσεων περίπου 6 εκ. ύψους και 2 εκ. πλάτους, δέχεται μια ελάχιστη ποσότητα υπό μορφή σταγονιδίου από τις ουσίες που θέλουμε να ελέγξουμε, στο κάτω μέρος της. Στην συνέχεια η πλάκα τοποθετείται εντός γυάλινου κυλινδρικού δοχείου το οποίο περιέχει τον διαλύτη ή το σύστημα διαλυτών (κινητή φάση) και κλείνεται αεροστεγώς.

Το τριχοειδές φαινόμενο που συμβαίνει στην πλάκα από τους διαλύτες, συμπαρασύρει μαζί του τις ουσίες προς δοκιμασία. Οι διάφορες ουσίες που περιέχονται στο υπό εξέταση δείγμα μετακινούνται επί της πλάκας με διαφορετική ταχύτητα ανάλογα με την πολικότητα τους και εμφανίζονται με τη μορφή διακριτών κηλίδων. Οι κηλίδες αυτές ανιχνεύονται είτε ψεκάζοντας με διάλυμα H_2SO_4 (θειϊκού οξέος) 30%, είτε μέσω UV ακτινοβολίας (254nm).

Η ανίχνευση στα 254nm UV ακτινοβολίας πραγματοποιήθηκε στην ειδική συσκευή UVGL-58 Mineralight Lamp.

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας τα παρακάτω συστήματα διαλυτών (v/v):

Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30

Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 80/20

Διάλυμα Γ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95/5

Διάλυμα Δ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 80/20

Διάλυμα Ε: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 50/50

Διάλυμα ΣΤ: οξικός αιθυλεστέρας 100

Διάλυμα Ζ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 70/30

3.2.2. Χρωματογραφία Στήλης

Η χρωματογραφία στήλης (Flash Column chromatography), χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των προϊόντων της αντίδρασης από διαλύτες και παραπροϊόντα.

Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν silica gel, 240-400 mesh, της Merck το οποίο προσροφητικό υλικό αποτελούσε και την στατική φάση. Οι διαλύτες έκλουσης που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής (ν/ν):

Διάλυμα Α: οξικός αιθυλεστέρας 100

Διάλυμα Β: οξικός αιθυλεστέρας/ εξάνιο 60/40

Διάλυμα Γ: οξικός αιθυλεστέρας/εξάνιο 70/30

Διάλυμα Δ: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 98/2

Διάλυμα Ε: διχλωρομεθάνιο / μεθανόλη 95/5

Ο διαχωρισμός του προϊόντος, πραγματοποιήθηκε με την υποβοήθηση του αέρα υπό πίεση, από τροφοδοσία στο άνω άκρο της στήλης. Από την άλλη άκρη της στήλης, εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά τα οποία λόγω του διαφορετικού βαθμού προσρόφησης στην silica gel, διαφέρουν και στον ρυθμό που παρασύρονται και μετακινούνται προς τα κάτω. Γενικά, οι πολικές ουσίες καθυστερούν σε σχέση με τις λιγότερες πολικές, και γι' αυτό και τα διαλύματα έκλουσης ξεκινούν από λιγότερα πολικά και καταλήγουν σε περισσότερο πολικά.

3.2.3. Ξήρανση Διαλυτών

Η πραγματοποίηση των αντιδράσεων, απαιτεί την χρήση άνυδρων διαλυτών. Η ξήρανση του ακετονιτριλίου (CH_3CN) γίνεται παρουσία υδριδίου του ασβεστίου με θέρμανση σε κάθετο ψυκτήρα υπό αναβρασμό κατά τη διάρκεια μιας νύχτας. Κατόπιν πραγματοποιείται απόσταξη υπό άζωτο και το απόσταγμα συλλέγεται σε φιάλη με μοριακά κόσκινα 3\AA (molecular sieves). Επίσης, και το N-N Διμέθυλοφορμαμίδιο DMF, (Dimethylformamide), ήταν σε αποθήκευση με μοριακά κόσκινα 3\AA .

3.2.4. Ταυτοποίηση ενώσεων με την τεχνική $^1\text{H-NMR}$

Η τεχνική του NMR, είναι σήμερα αναγνωρισμένη ως μία από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές για την πιστοποίηση της δομής χημικών ενώσεων. Έχει πλήθος εφαρμογών που μεταξύ αυτών στην χημεία και την φαρμακευτική, είναι η διερεύνηση της τρισδιάστατης δομής και η μελέτη δυναμικών φαινομένων.

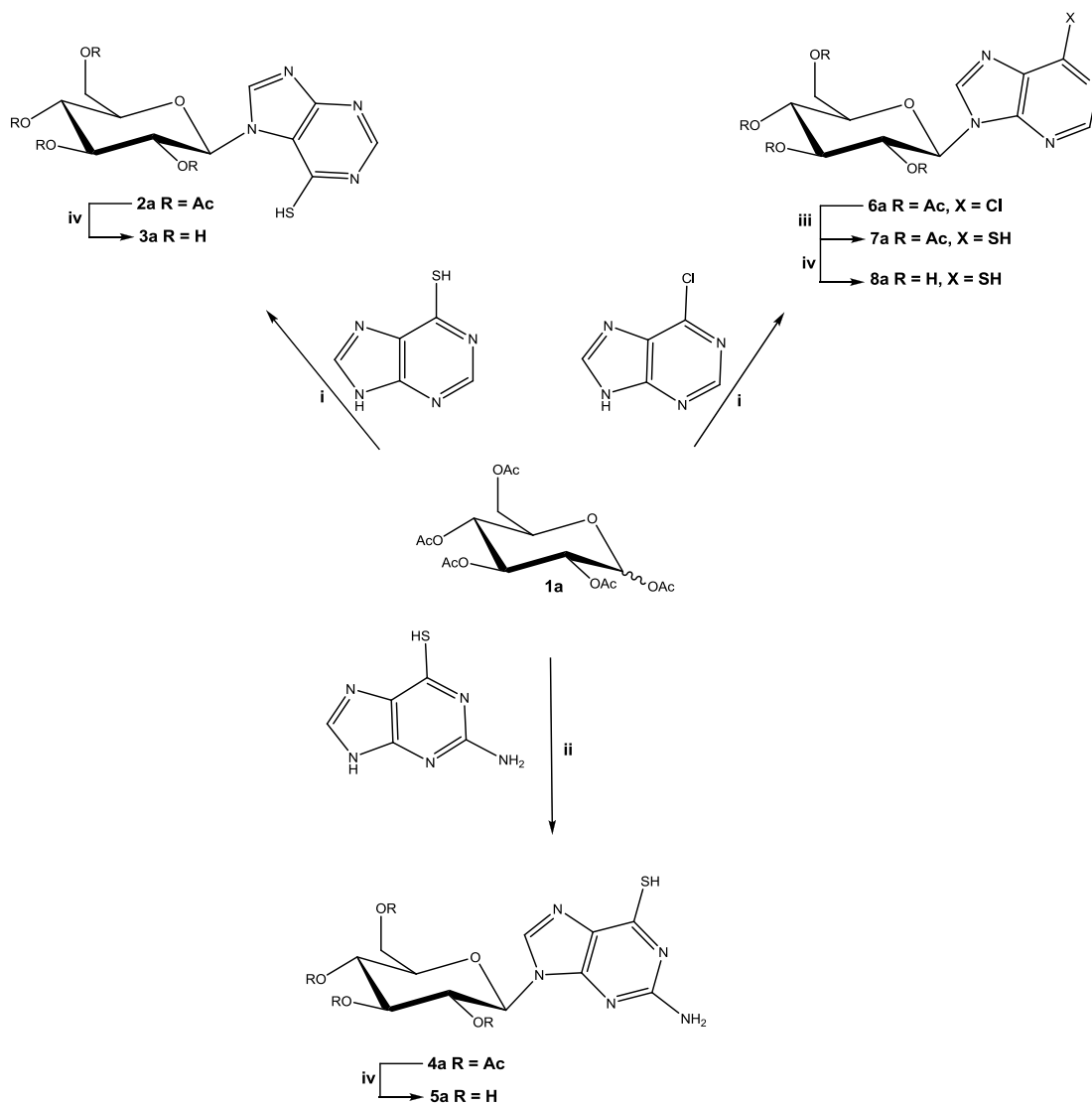
Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με την φασματοσκοπική μέθοδο του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance) $^1\text{H-NMR}$ και $^{13}\text{C-NMR}$. Το φασματόμετρο Bruker 400 εκτέλεσε τον προσδιορισμό της δομής των μορίων στα 400 MHz για τα φάσματα πρωτονίου, και στα 100 MHz για τα φάσματα του Άνθρακα-13, σε θερμοκρασία δωματίου.

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο NMR, ήταν το χλωροφόρμιο-d (CDCl_3), η μεθανόλη-d₄ (CD_3OD) και το διμεθυλοσουλφοξείδιο-d₆ (DMSO-d_6). Το τελευταίο χρησιμοποιείται στις μεγάλες θερμοκρασίες $>140^\circ\text{C}$, ενώ όλοι οι διαλύτες είναι δευτεριωμένοι (98-99%) και δεν παρουσιάζουν ταινίες απορρόφησης πρωτονίου.

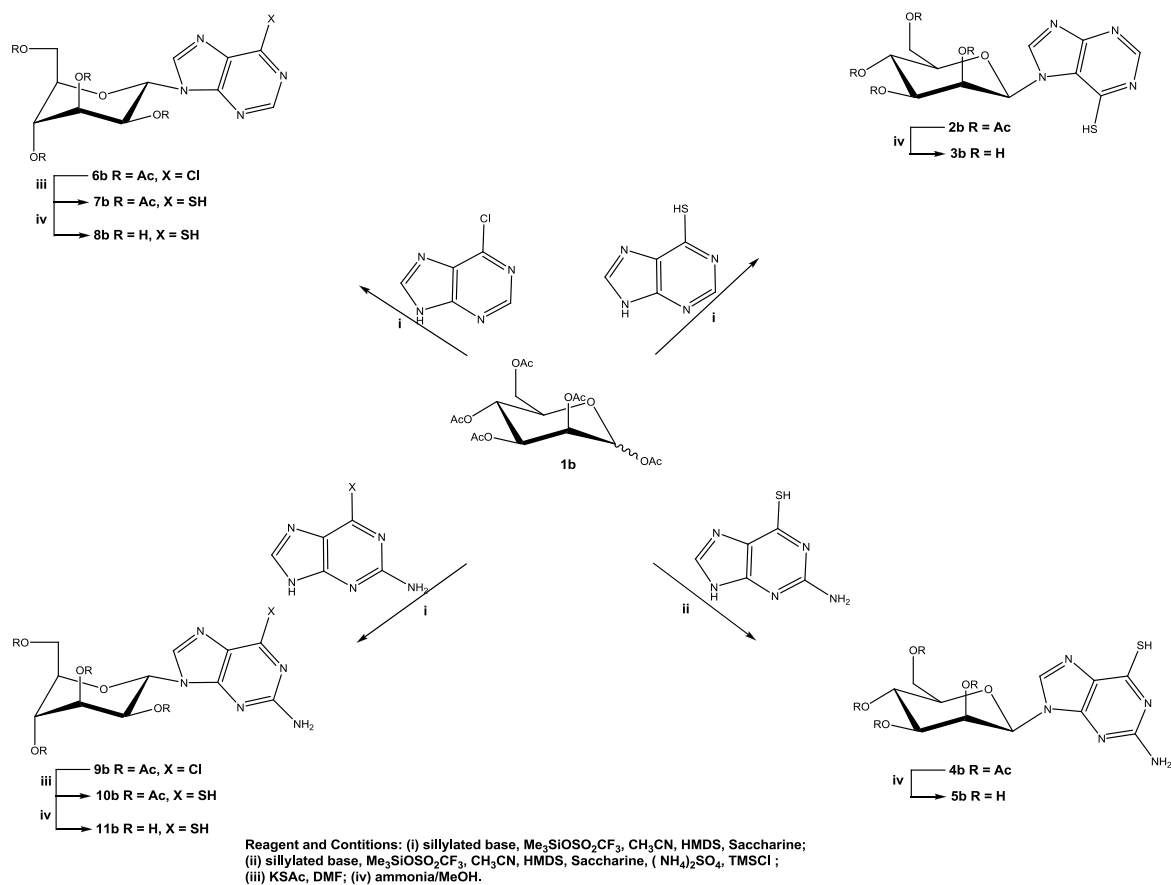
Ως ουσία αναφοράς για τα φάσματα, επιλέχθηκε το τετραμεθυλοσιλάνιο (TMS) $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ διότι διαλύεται σχεδόν σε όλους τους διαλύτες εκτός από το νερό, είναι χαμηλού σημείου ζέσεως, και το κυριότερο, δίνει μία έντονη ταινία απορρόφησης πολύ μακριά από κάθε άλλη οργανική χημική ένωση. Η πολλαπλότητα των καμπύλων φαίνεται με s (single), d (doublet), dd (doublet doublet), dtr (doublet triplet), και m (multiplet). Οι σταθερές σύζευξης J μετρήθηκαν σε Hz.

3.3. Μέθοδοι

3.3.1. Επισκόπηση της συνθετικής οδού.



Σχήμα 2. Επισκόπηση της σύνθεσης με σάκχαρο την γλυκόζη



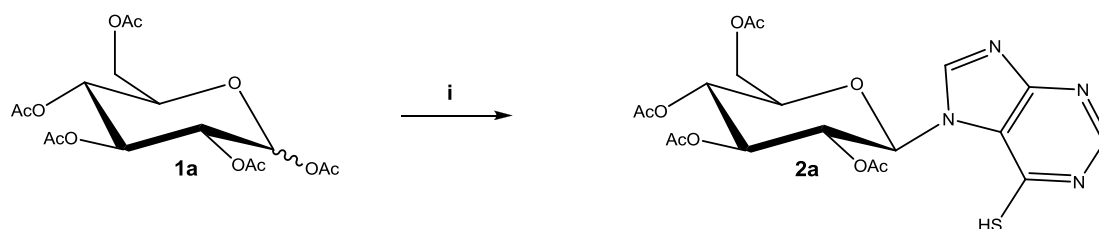
Σχήμα 3. Επισκόπηση της σύνθεσης με σάκχαρο την μαννόζη.

3.4. Μεθοδολογία της σύνθεσης.

Η πορεία της σύνθεσης ξεκίνησε με την σύζευξη της εμπορικά διαθέσιμης 1,2,3,4,6-πεντε-Ο-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζης (1a), με τις ετεροκυκλικές βάσεις 6-μερκαπτοπουρίνη, 6-θειογουανίνη, 2-αμινο-6-χλωροπουρίνη και 6-χλωροπουρίνη παρουσία του άνυδρου διαλύτη ακετονιτριλίου (CH_3CN), εξαμεθυλοδισιλαζάνιου (HMDS) καθώς και καταλυτικής ποσότητας σακχαρίνης και με την προσθήκη του τριφθορομεθανοσουλφονικού τριμεθυλοσιλυλεστέρα ($\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$).

Έτσι ελήφθησαν οι προστατευμένοι νουκλεοζίτες 1-(2',3',4',6'-τετρα-Ο-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-7-μερκαπτοπουρίνη (2a) , 9-θειογουανίνη (4a) και 9-χλωροπουρίνη (6a) με ικανοποιητικές αποδόσεις 60% - 77%. Στη συνέχεια ακολούθησε η κατεργασία του παραγώγου της 6-χλωροπουρίνης (6a) με το θειοακετοξικό κάλιο (KSAC) παρουσία άνυδρου διαλύτη *N,N*-διμέθυλοφορμαμίδιου (DMF). Τέλος, ακολουθεί η απακετυλίωση των προστατευμένων νουκλεοζιτών (2a), (4a) και (7a) με κορεσμένο διάλυμα μεθανολικής αμμωνίας, η οποία οδήγησε στην σύνθεση των αποπροστατευμένων ενώσεων 1-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-θειοπουρινών (3a), (5a) και (8a) με αρκετά καλές αποδόσεις 64% - 73%. Η ίδια πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκε και στην περίπτωση της μαννόζης (1b).

3.4.1. Σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνη (2a).



Σχήμα 4. Σύνθεση του 2a

Ένα διάλυμα της 6-μερκαπτοπουρίνης (3.33 mmol, 1.3 eq), του HMDS (5.33 mmol, 1.60 eq) και της σακχαρίνης (0.20 mmol, 0.06 eq), σε άνυδρο CH_3CN (14.00 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 5 ώρες στους 125°C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,3,4,6-πεντε-O-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζης (1a), (2.56 mmol) καθώς και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (3.84 mmol, 1.5 eq).

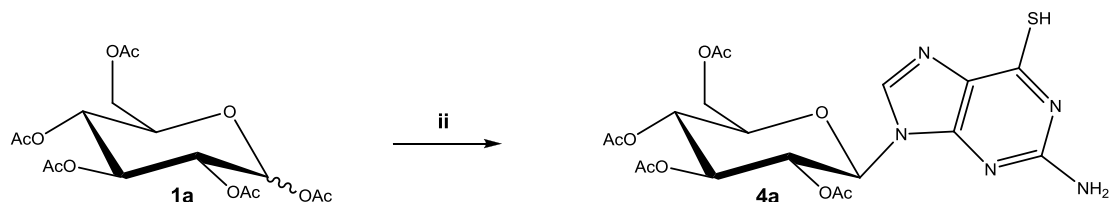
Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 8 ώρες (TLC πίνακας 1) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Δ.

Το επιθυμητό προϊόν (2a) (0.65g) ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης κίτρινου χρώματος .

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0.19$
λ_{max}	277nm
$[\alpha]_D^{22}$	+10 $c = 0.25$

Πίνακας 1. Αποτελέσματα σύνθεσης της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (2a) .

3.4.2. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-θειοπουρίνης (4a).



Σχήμα 5. Σύνθεση του 4a

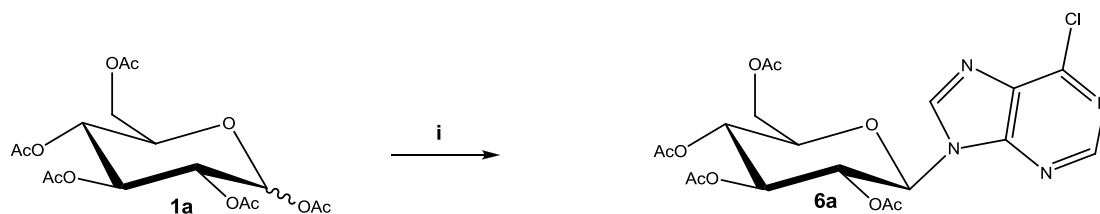
Ένα διάλυμα της 6-θειογουανίνης (3.33 mmol, 1.3 eq), του HMDS (5.33 mmol, 1.60 eq), της σακχαρίνης (0.20 mmol, 0.06 eq), του $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.66 mmol, 1.4 eq) και του TMSCl (0.27 mmol, 0.11 eq) σε άνυδρο CH_3CN (14.00 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 5 ώρες στους 125°C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,3,4,6-πεντε-O-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζης (1a), (2.56 mmol) καθώς και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (3.84 mmol, 1.5 eq).

Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 8 ώρες (TLC πίνακας 2) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Β. Το επιθυμητό προϊόν (4a) (0.77g) ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης λευκού χρώματος.

TLC (Διάλυμα ΣΤ)	$R_f = 0.28$
λ_{max}	308nm
$[\alpha]_D^{22}$	+2 $c = 0.21$

Πίνακας 2. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-θειοπουρίνης (4a) .

3.4.3. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-χλωροπουρίνης (6a).



Σχήμα 6. Σύνθεση του 6a

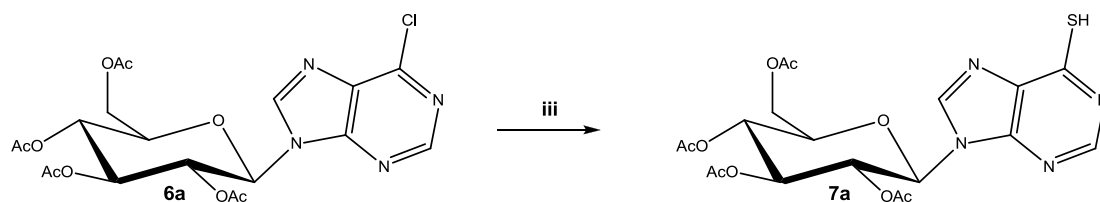
Ένα διάλυμα της 6-χλωροπουρίνης (3.33 mmol, 1.3 eq), του HMDS (5.33 mmol, 1.60 eq) και της σακχαρίνης (0.20 mmol, 0.06 eq), σε άνυδρο CH_3CN (14.00 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120°C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,3,4,6-πεντε-O-ακετυλο-D-γλυκοκυρανόζης (1a), (2.56 mmol) καθώς και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (3.59 mmol, 1.4 eq).

Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 3) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα B. Το επιθυμητό προϊόν (6a) (0.60g) ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης λευκού χρώματος.

TLC (Διάλυμα A)	$R_f = 0.35$
λ_{max}	264nm
$[\alpha]_D^{22}$	-4 $c = 0.21$

Πίνακας 3. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-χλωροπουρίνης (6a).

3.4.4. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (7a).



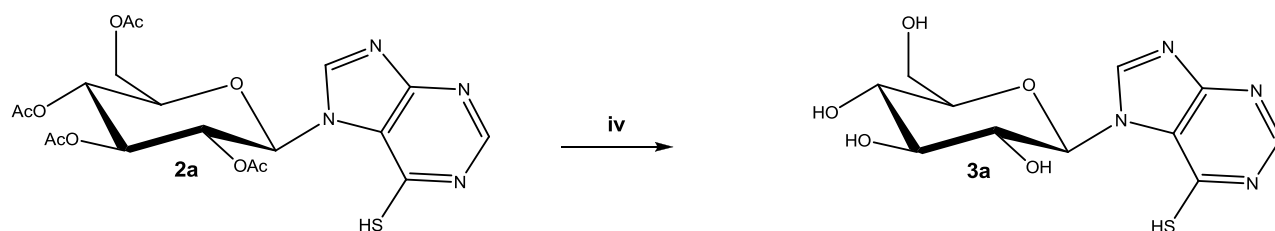
Σχήμα 7. Σύνθεση του 7a

Ένα διάλυμα του παραγώγου (6a) (1mmol), παρουσία άνυδρου διαλύτη DMF (4.0ml) και με την προσθήκη του KSAc (1.38 mmol) θερμάνθηκε με σύστημα επαναροής κάθετου ψυκτήρα για 30 λεπτά παρουσία αζώτου. Κατόπιν, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. (TLC πίνακας 4) Το επιθυμητό προϊόν (7a) 62% ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης κίτρινου χρώματος.

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f = 0.31$
λ_{\max}	269nm
$[\alpha]_D^{22}$	-4 $c = 0.15$

Πίνακας 4. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (7a) .

3.4.5. Σύνθεση της 7-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3a).



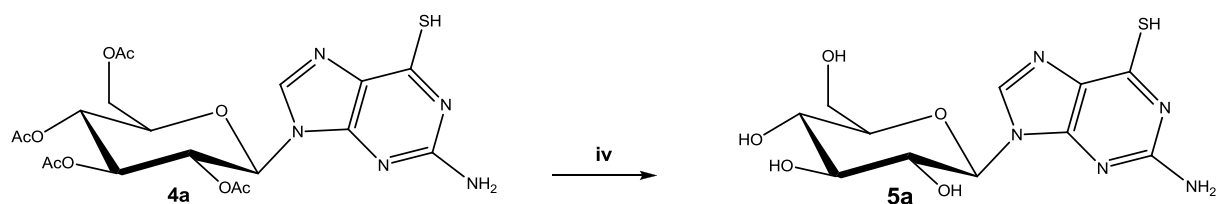
Σχήμα 8. Σύνθεση του 3a

Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη 2a (0.8 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν (3a) με απόδοση 64% με μορφή σκόνης κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 5)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0.25$
λ_{\max}	280nm
$[\alpha]_D^{22}$	+8 $c = 0.25$

Πίνακας 5. Αποτελέσματα σύνθεσης της 7-(β-D-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3a) .

3.4.6. Σύνθεση της 9-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5a).



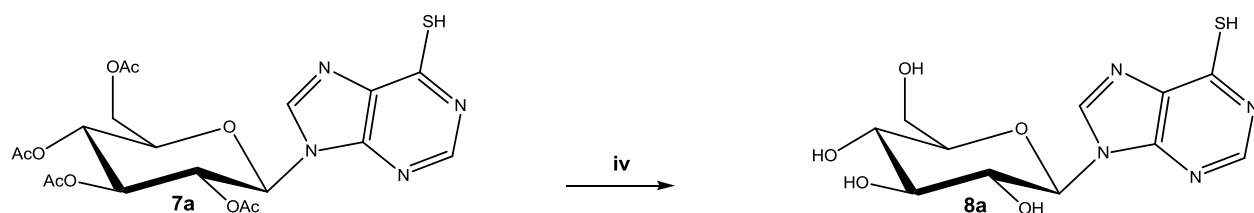
Σχήμα 9. Σύνθεση του 5a

Το προϊόν 5a συντέθηκε από το προϊόν 4a με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 3a. Το επιθυμητό προϊόν (5a) (77%) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 6)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0.24$
λ_{\max}	312nm
$[\alpha]_D^{22}$	+2 $c = 0.10$

Πίνακας 6. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5a) .

3.4.7. Σύνθεση της 9-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (8a).



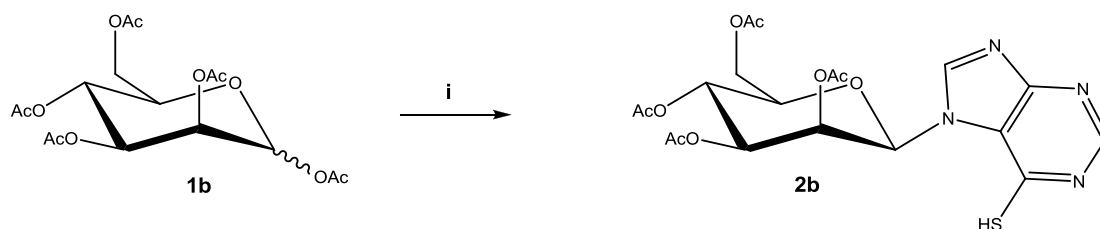
Σχήμα 10. Σύνθεση του 8a

Το προϊόν 8a συντέθηκε από το προϊόν 7a με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 3a. Το επιθυμητό προϊόν (**8a**) (64%) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 7)

TLC (Διάλυμα E)	$R_f = 0.34$
λ_{\max}	273nm
$[\alpha]_D^{22}$	-3 $c = 0.22$

Πίνακας 7. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(β-D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (**8a**) .

3.4.8. Σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (2b).



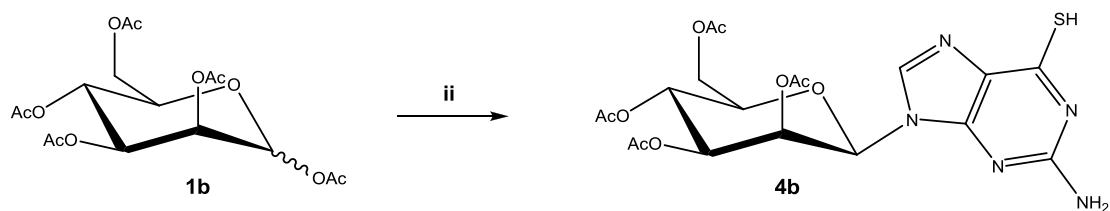
Σχήμα 11. Σύνθεση του 2b

Το προϊόν 2b συντέθηκε από το προϊόν 1b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 2a. Το επιθυμητό προϊόν (2b) (78%) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 8)

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0.19$
λ_{\max}	342nm
$[\alpha]_D^{22}$	+10 $c = 0.25$

Πίνακας 8. Αποτελέσματα σύνθεσης της 7-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (2b) .

3.4.9. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειοπουρίνης (4b).



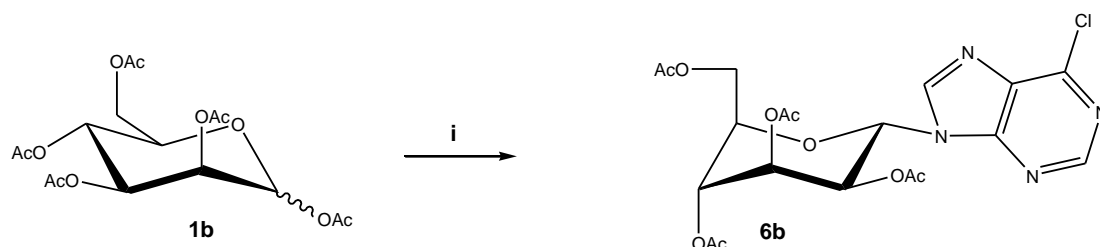
Σχήμα 12. Σύνθεση του 4b

Το προϊόν 4b συντέθηκε από το προϊόν 1b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 2a. Το επιθυμητό προϊόν (4b) (79%) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 9)

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0.45$
λ_{\max}	315nm
$[\alpha]_D^{22}$	+8 $c = 0.20$

Πίνακας 9. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (4b) .

3.4.10. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-χλωροπουρίνης (6b).



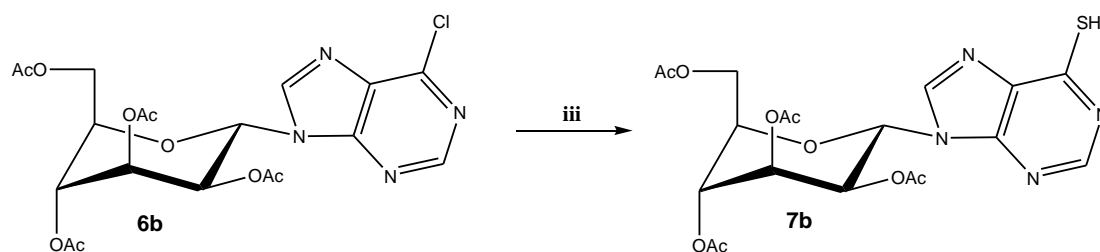
Σχήμα 13. Σύνθεση του 6b

Το προϊόν 6b συντέθηκε από το προϊόν 1b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 2a. Το επιθυμητό προϊόν (**6b**) (67%) ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 10)

TLC (Διάλυμα A)	$R_f = 0.53$
λ_{\max}	264nm
$[\alpha]_D^{22}$	+10 $c = 0.32$

Πίνακας 10. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-χλωροπουρίνης (6b) .

3.4.11. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτουρίνης (7b).



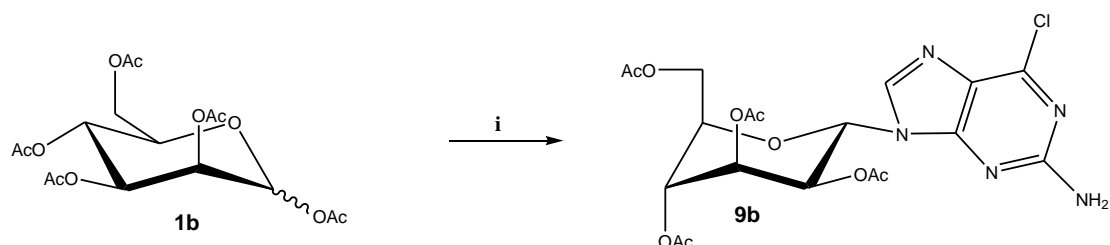
Σχήμα 14. Σύνθεση του 7b

Ένα διάλυμα του παραγώγου (6b) (1mmol), παρουσία άνυδρου διαλύτη DMF (4.0ml) και με την προσθήκη του KSAc (1.38 mmol) θερμάνθηκε με σύστημα επαναροής κάθετου ψυκτήρα για 30 λεπτά παρουσία αζώτου. Κατόπιν, ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (7b) 59% ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 11)

TLC (Διάλυμα Β)	$R_f = 0.46$
λ_{\max}	296nm
$[\alpha]_D^{22}$	+6 $c = 0.25$

Πίνακας 11. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτουρίνης (7b) .

3.4.12. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-χλωροπυρίνης (9b).



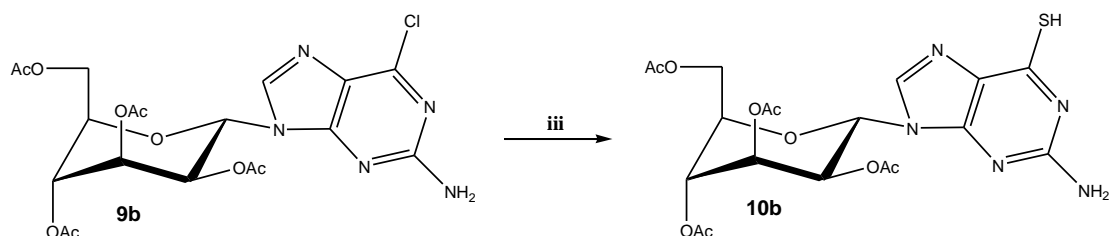
Σχήμα 15. Σύνθεση του 9b

Ένα διάλυμα της 2-αμινο-6-χλωροπυρίνης (3.33 mmol, 1.3 eq), του HMDS (5.33 mmol, 1.60 eq) και της σακχαρίνης (0.20 mmol, 0.06 eq), σε άνυδρο CH_3CN (14.00 mL), θερμάνθηκε με κάθετο ψυκτήρα για 1 ώρα στους 120°C και αφότου το μίγμα έγινε διαυγές προστέθηκε η 1,2,3,4,6-πεντε-O-ακετυλο-D-γλυκοπυρανόζης (1b), (2.56 mmol) καθώς και $\text{Me}_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$ (3.59 mmol, 1.4 eq). Η αντίδραση ολοκληρώθηκε στις 3 ώρες (TLC πίνακας 12) με θέρμανση με κάθετο ψυκτήρα. Στη συνέχεια το μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε να κρυώσει, εξουδετερώθηκε με κορεσμένο διάλυμα NaHCO_3 , αραιώθηκε με CH_2Cl_2 (200ml). Κατόπιν, η οργανική φάση ξηράθηκε με άνυδρο Na_2SO_4 και ο διαλύτης απομακρύνθηκε υπό κενό. Ακολούθησε καθαρισμός του υπολείμματος σε στήλη χρωματογραφίας (silica gel) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης το διάλυμα Γ. Το επιθυμητό προϊόν (9b) 64% ελήφθη υπό τη μορφή σκόνης λευκού χρώματος .

TLC (Διάλυμα B)	$R_f = 0.26$
λ_{max}	319nm
$[\alpha]_D^{22}$	+8 $c = 0.39$

Πίνακας 12. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-χλωροπυρίνης (9b) .

3.4.13. Σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-θειογουανίνης (10b).



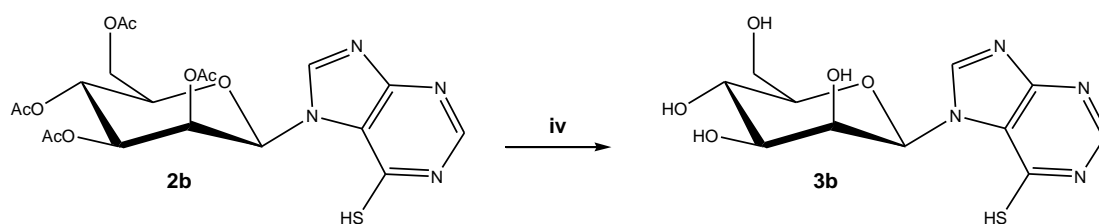
Σχήμα 16. Σύνθεση του 10b

Το προϊόν 10b συντέθηκε από το προϊόν 9b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 7b. Το επιθυμητό προϊόν (**10b**) 58% ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 13)

TLC (Διάλυμα Γ)	$R_f = 0.36$
λ_{\max}	356nm
$[\alpha]_D^{22}$	-10 $c = 0.22$

Πίνακας 13. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(2',3',4',6'-τετρα-O-ακετυλο-α-D-μαννοπυρανοζυλο)-2-αμινο-6-θειογουανίνης (10b) .

3.4.14. Σύνθεση της 7-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3b).



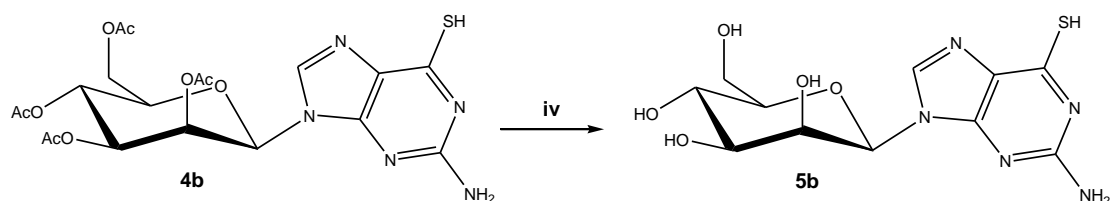
Σχήμα 17. Σύνθεση του 3b

Διάλυμα του προστατευμένου νουκλεοζίτη 2b (0.8 mmol) σε μεθανολική αμμωνία αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12h ώρες. Ο διαλύτης στη συνέχεια απομακρύνεται υπό κενό, οπότε παραλαμβάνεται το επιθυμητό προϊόν (3b) με απόδοση 75% με μορφή σκόνης κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 14)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0.25$
λ_{\max}	279nm
$[\alpha]_D^{22}$	-4 $c = 0.15$

Πίνακας 14. Αποτελέσματα σύνθεσης της 7-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης (3b) .

3.4.15. Σύνθεση της 9-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5b).



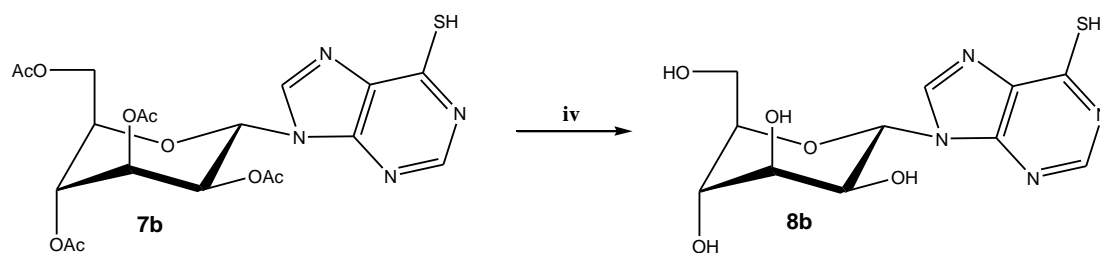
Σχήμα 18. Σύνθεση του 5b

Το προϊόν 5b συντέθηκε από το προϊόν 4b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 3b. Το επιθυμητό προϊόν (**5b**) 70% ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 15)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0.24$
λ_{\max}	312nm
$[\alpha]_D^{22}$	+2 $c = 0.10$

Πίνακας 15. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (5b) .

3.4.16. Σύνθεση της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτουρίνης (8b).



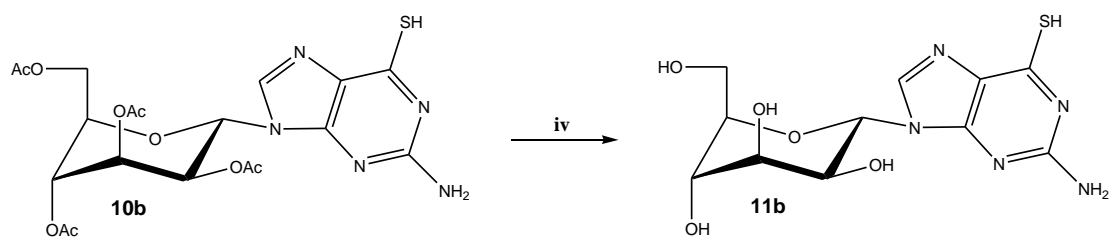
Σχήμα 19. Σύνθεση του 8b

Το προϊόν 8b συντέθηκε από το προϊόν 7b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 3b. Το επιθυμητό προϊόν (**8b**) 73% ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού κίτρινου χρώματος. (TLC πίνακας 16)

TLC (Διάλυμα Δ)	$R_f = 0.29$
λ_{\max}	294nm
$[\alpha]_D^{22}$	+4 $c = 0.18$

Πίνακας 16. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτουρίνης (8b) .

3.4.17. Σύνθεση της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (11b).



Σχήμα 20. Σύνθεση του 11b

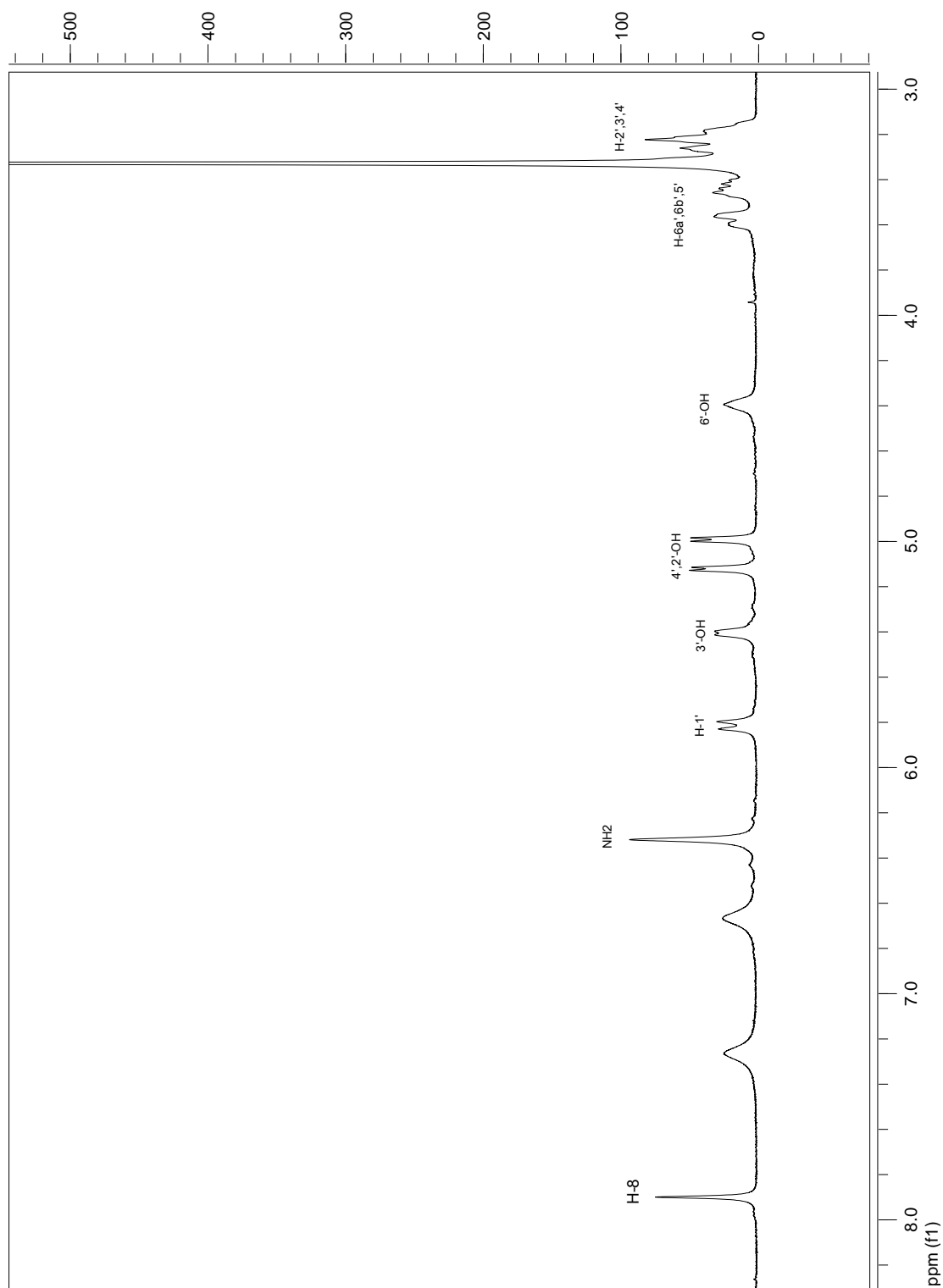
Το προϊόν 11b συντέθηκε από το προϊόν 10b με την ίδια διαδικασία που περιγράψαμε παραπάνω με το προϊόν 3b. Το επιθυμητό προϊόν (**11b**) 68% ελήφθη υπό τη μορφή αφρώδους στερεού λευκού χρώματος. (TLC πίνακας 17)

TLC (Διάλυμα Z)	$R_f = 0.19$
λ_{\max}	354nm
$[\alpha]_D^{22}$	-2 $c = 0.10$

Πίνακας 17. Αποτελέσματα σύνθεσης της 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (11b) .

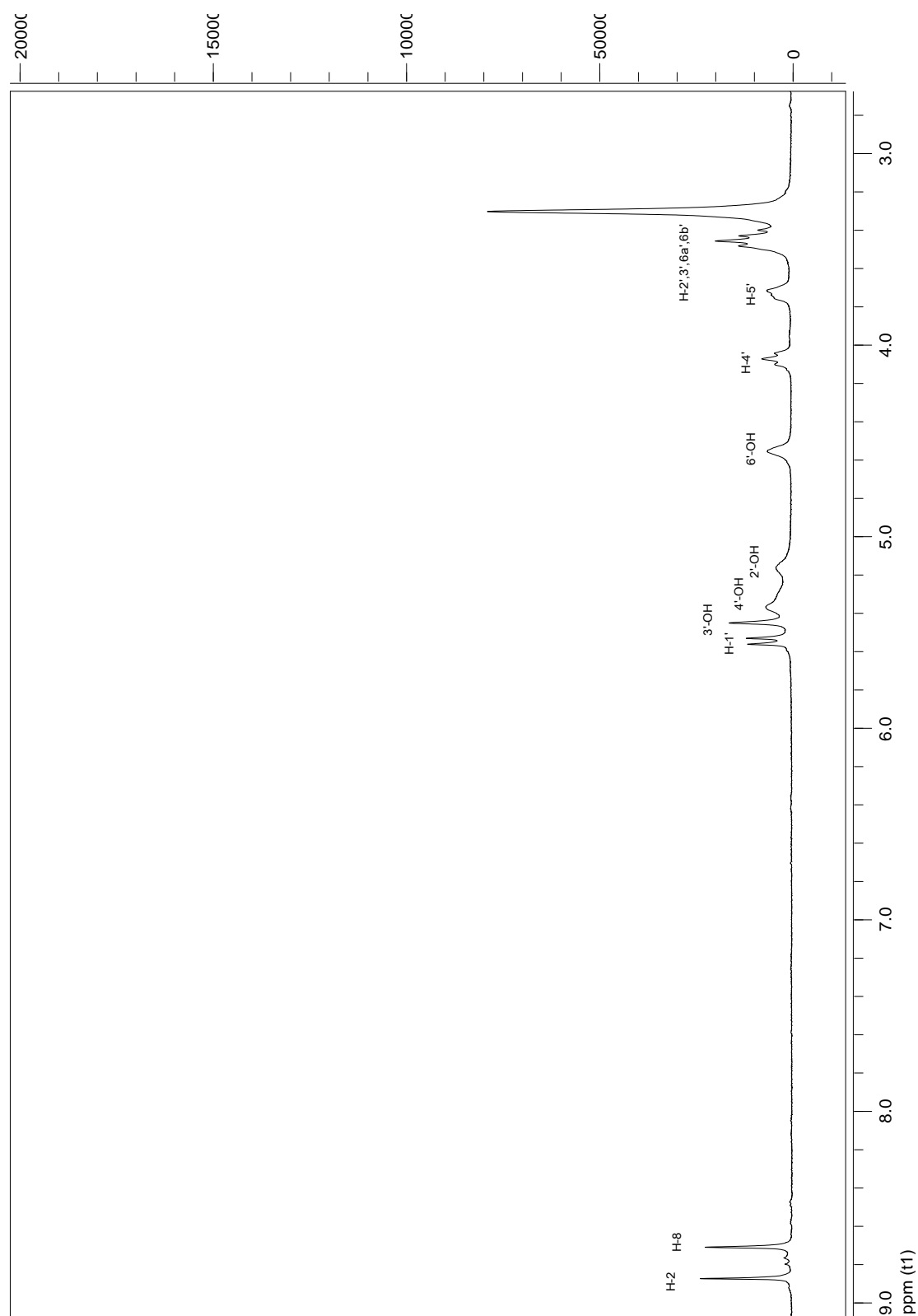
4.0. Ταυτοποίηση με ^1H NMR

4.1. Φάσμα ^1H NMR της 9-(β -D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης



Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος 5a.

4.2. Φάσμα ^1H NMR της 9-(β -D-γλυκοκυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπυρίνης



Εικόνα 30. Φάσμα ^1H NMR του τελικού προϊόντος 8a.

5.0. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων ως πιθανά φάρμακα προέκυψε από τις προσπάθειες των ερευνητών για την καταπολέμηση χρόνιων νόσων όπως κακοήθεις νεοπλασίες και ιικές μολύνσεις. Βασικός σκοπός όλων των ερευνητικών μελετών και προσπαθειών είναι η ανάπτυξη νουκλεοζιτικών αναλόγων, που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα σε υγιή κύτταρα όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και εκλεκτικότητα όσον αφορά στην δράση τους.

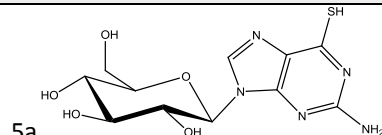
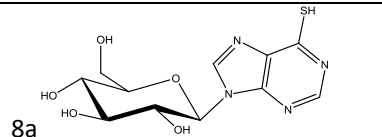
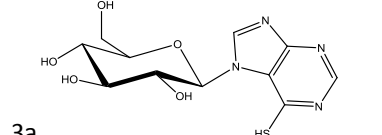
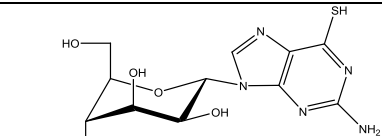
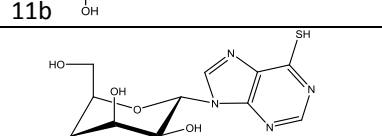
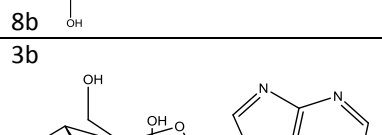
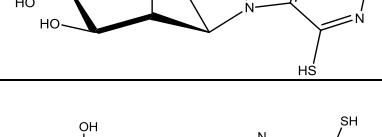
Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μιας νέας τάξης θειοπυρανονουκλεοζιτών της μερκαπτοπουρίνης και της θειογουανίνης που φέρουν τα σάκχαρα γλυκόζη και μαννόζη, με πιθανή αντικαρκινική και αντιική δράση. Η πειραματική διαδικασία ήταν σχετικά απλή, ταχεία, έχοντας πραγματοποιήσει σύντομα βήματα.

Οι τελικές αποδόσεις που πήραμε από τη σύνθεση των τελικών θειοπυρανονουκλεοζιτών είναι αρκετά καλές. Πιο συγκεκριμένα, η σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (2a) είχε απόδοση 65% ενώ η 9-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (7a) είχε απόδοση 62%. Η σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (4a) είχε απόδοση 77%. Οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες 7-(β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)- και 9-(β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)- της μερκαπτοπουρίνης (3a, 8a) είχαν απόδοση 64% και η 9-(β-*D*-γλυκοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνη (5a) είχε απόδοση 73%.

Στην περίπτωση της μαννόζης η σύνθεση της 7-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (2b) είχε απόδοση 78% ενώ η 9-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-α-*D*-μαννοπυρανοζυλο)-6-μερκαπτοπουρίνης (7b) είχε απόδοση 59%. Η σύνθεση της 9-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-β-*D*-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (4b) είχε απόδοση 79% ενώ η 9-(2',3',4',6'-τετρα-*O*-ακετυλο-α-*D*-μαννοπυρανοζυλο)-6-θειογουανίνης (10b) είχε απόδοση 58%. Οι αποπροστατευμένοι νουκλεοζίτες 7-(β-*D*-μαννοπυρανοζυλο)- και η 9-(α-*D*-μαννοπυρανοζυλο)- της μερκαπτοπουρίνης (3b, 8b) είχαν αποδόσεις 75% και 73%

αντίστοιχα. Η 9-(β-D-μαννοπυρανοζυλο)- και η 9-(α-D-μαννοπυρανοζυλο)- της θειογουανίνης (5b,11b) είχαν αποδόσεις 70% και 68% αντίστοιχα.

Όλες οι νέες ενώσεις χαρακτηρίζονται από αναλύσεις φάσματος πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ^1H NMR.

Προϊόν	IC ₅₀ [*] (μM)			EC ₅₀ (μM)	
	L1210	CEM	HeLa	HIV-1	HIV-2
 5a	66 ± 23	102 ± 10	51 ± 17	>50	>50
 8a	158 ± 5	> 250	> 250	> 250	> 250
 3a	161 ± 41	201 ± 38	95 ± 22	> 250	> 250
 11b	146 ± 32	> 250	> 250	> 250	> 250
 8b	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
 3b	131 ± 39	128 ± 5	72 ± 14	>50	>50
 5b	37 ± 1	31 ± 3	22 ± 9	>50	>50
6-mercaptopurine	2.8 ± 1.1	2.8 ± 1.3	1.1 ± 0.1	>2	>2
6-thioguanine	0.94 ± 0.04	1.1 ± 0.3	0.38 ± 0.17	>0.4	>0.4

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικά δεδομένα δεικτών βιολογικής αποτίμησης για τα προϊόντα των συνθέσεων και των θειοπουρίνων

Όλα τα μόρια αξιολογήθηκαν για την κυτταροτοξική και κυτταροστατική τους δράση έναντι κυττάρων λευχαιμίας ποντικού (L1210), ανθρώπινου λεμφώματος (CEM) καθώς και των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την εκτίμηση της κυτταροστατικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος IC_{50} , η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%.

Για την εκτίμηση της αντιϊκής δράσης έναντι του ιού HIV χρησιμοποιήθηκε η παράμετρος EC_{50} . Η παράμετρος EC_{50} αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φάρμακου που απαιτείται για την καταστολή της ανάπτυξης των κυττάρων κατά 50%.

Όπως παρατηρούμε από τον παραπάνω πίνακα την καλύτερη κυτταροτοξική δράση εμφάνισαν οι νουκλεοζίτες της θειογουανίνης 5a (51 - 102 μ M) και 5b (22 - 37 μ M).

6.0. Βιβλιογραφία

- 1) Στοιχεία Χημείας Τροφίμων. Κεφάλαιο 2. Υδατάνθρακες. Σημ. Μαθήματος: Επιστήμη και Μηχανική Βιολογικών Συστημάτων και Προϊόντων (Τρόφιμα-Βιοτεχνολογία).: Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ.
- 2) Γενική Χημεία Darrell D. Gammon, Steven D. Ebbing. [μεταφρ.] Νικόλαος Δ. Κλούρας. 6. Αθήνα : ΤΡΑΥΛΟΣ Εκδοτικός οίκος, 2002. σσ. 1085-1090. Τόμ. Ι. 960-7990-66-8.
- 3) Οργανική Χημεία ΙΙ. McMurry, John. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2006. σσ. 904-905, 1235-1288. Τόμ. ΙΙ. 960-524-056-4.
- 4) Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών Michael T. Madigan, John M. Martinko, Jack Parker [επιμ.] Τάσος Οικονόμου. 10. Ηράκλειο : Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2005. σσ. 45-59. Τόμ. Ι. 960-524-200-1.
- 5) ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ - ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ. Επιστήμη και Μηχανική Τροφίμων [Web]<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/emt/?page=material>.
- 6) JEREMY M. BERG, JOHN L. TYMOCZKO, LUBERT STRYER. Biochemistry 5th Edition. s.l.: W. H. Freeman and Company and Sumanas, Inc. σ. 194.
- 7) Balatsos, N. A.; Vlachakis, D.; Maragozidis, P.; Manta, S.; Anastasakis, D.; Kyritsis, A.; Vlassi, M.; Komiotis D.; Stathopoulos, C. Biochemistry 2009, 48, 6044–6051
- 8) Tsirkone, V. G.; Tsoukala, E.; Lamprakis, C.; Manta, S.; Hayes, J. M.; Skamnaki, V. T.; Drakou, C.; Zographos, S. E.; Komiotis D.; Leonidas, D. D. 18, 3413–3425. Bioorganic & medicinal chemistry 2010
- 9) Komiotis, D.; Delatre, S.; Holt, L.; Ollapally, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E.; Ligo, M. Nucleosides Nucleotides 1991, 10, 431.
- 10) Komiotis, D.; Manta, S.; Tsoukala, E.; Tzioumaki, N. Curr. Med. Chem.: Anti-Infect. Agents 2008, 7, 219.

- 11) Agelis, G.; Tzioumaki, N.; Botić, T.; Cencič, A.; Komiotis, D. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 5548.
- 12) Zhou, W.; Gumina, G.; Chong, Y.; Wang, J.; Schinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2004, 47, 3399.
- 13) Perigaud, C.; Gosselin, G.; Imbach, J. L. *Nucleosides Nucleotides* 1992, 11, 903.
- 14) Gumina, G.; Song, G. Y.; Chu, C. K. *FEMS Microbiology Letters* 2001, 202, 9.
- 15) PubChem. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. [Ηλεκτρονικό] [Παραπομπή: 18 April 2013.] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=60750>.
- 16) Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Section of Cellular and Molecular Pharmacology*, 22 Αυγούστου 1995, Τόμ. (4 Suppl. 11): 3 - 10. PMID: 7481842 [PubMed - indexed for MEDLINE].
- 17) Galinos beta. Γαληνός. [Ηλεκτρονικό] Ergobyte Πληροφορική Α.Ε. [Παραπομπή: 19 Απρίλιος 2013.] <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/gemcitabine>
- 18) Cancer Research UK. GemCarbo (gemcitabine and carboplatin). [Ηλεκτρονικό] 11 Μάρτιος 2013. <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/about-cancer/treatment/cancer-drugs/gemcarbo>.
- 19) Οργανική Φαρμακευτική Χημεία 2010 – 2011 [Σημειώσεις μαθήματος]: Σχολή Φαρμακευτικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- 20) John A Secrist III “Nucleosides as anticancer agents: from concept to clinic” *Nucleic Acids Symp Ser* 49 (September 2005) (1): 15-16. <http://nass.oxfordjournals.org/content/49/1/15.abstract>
- 21) Matsuda, A.; Sasaki, T. *Cancer Sci.* 2004, 95, 105

- 22) Cory, A. H.; Samano, V.; Robins, M. J.; Cory, J. G. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 365.
- 23) Lui, V. W. Y. W.; Lau, C. P. Y. P.; Cheung, C. S. F. S.; Ho, K.; Ng, M. H. L. H.; Cheng, S. H. H.; Hong, B.; Tsao, S.-W. W.; Tsang, C. M. M.; Lei, K. I. K. I.; Yamasaki, Y.; Mita, A.; Chan, A. T. *Biochemical pharmacology* 2010, 79, 1772–1780.
- 24) Bhat, U. G.; Pandit, B.; Gartel, A. L. *Molecular cancer therapeutics* 2010 ‘ARC synergizes with ABT-737 to induce apoptosis in human cancer cells’
- 25) Vander M.D., Sherman P.D., Luciano P.D., Τσακόπουλος Μ. Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού. 8η Έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- 26) Arner, E. S. J.; Eriksson, S. *Pharmacol. Ther.* 1995, 67, 155.
- 27) C M Galmarin¹, J R Mackey and C Dumontet June 2001, Volume 15, Number 6, Pages 875-890 Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies
- 28) Erik De Clercq Strategies in the design of antiviral drugs *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 13-25 (January 2002) doi: 10.1038/nrd703 FIGURE 4 | Examples of antiviral nucleoside analogues acting by a chain termination mechanism.
- 29) Chong, Y.; Choo, H.; Lee, S.; Choi, Y.; Shcinazi, R. F.; Chu, C. K. *J. Med. Chem.* 2002, 45,4888
- 30) Hideshi Hattori, Eisuke Nozawa, Tomoharu Iino, Yuichi Yoshimura, Satoshi Shuto, Yuji Shimamoto, Makoto Nomura,, Masakazu Fukushima, Motohiro Tanaka, Takuma Sasaki, and Akira Matsuda. *J. Med. Chem.* 1998, 41, 2892 ‘Nucleosides and Nucleotides. 175. Structural Requirements of the Sugar Moiety for the Antitumor Activities of New Nucleoside Antimetabolites, 1-(3-C -Ethyanyl-β- d - ribo -pentofuranosyl)cytosine and -uracil 1’

- 31) Manta, S.; Agelis, G.; Botic, T.; Cencic, A.; Komiotis D. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2007, 15, 980–987
- 32) Zaza Gianluigi, Cheok Meyling, Krynetskaia Natalia, Thorn Caroline, Stocco Gabriele, Hebert Joan M, McLeod Howard, Weinshilboum Richard M, Relling Mary V, Evans William E, Klein Teri E, Altman Russ B. "Thiopurine pathway" *Pharmacogenetics and genomics* (2010).
- 33) *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Aug; 64(8):753-67.doi: 10.1007/s00228-008-0478-6. Epub 2008 May 28. Clinical pharmacology and Pharmacogenetics of thiopurines. Sahasranaman S, Howard D, Roy S.
- 34) Daehn I, Brem R, Barkauskaite E, Karran P. 6-Thioguanine damages mitochondrial DNA and causes mitochondrial dysfunction in human cells. PubMed, Cancer Research UK London Research Institute, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062154>
- 35) PubChem. 6-Mercaptopurine - Compound Summary (CID 667490). NCBI. [Web] <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=667490>.
- 36) Πανάγος, Γ. Κεφάλαιο 49. Αντινεοπλασματικά φάρμακα με περιορισμένες ενδείξεις και αμφισβητούμενης κατάταξης . ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑ. [Web] http://www.onco.gr/documents/Panagos_mi_katatassomena.pdf.